

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier

**Klinisch-experimentelle Analyse zur Expression von IDO1  
und TREM2 in Blut- und Gewebeproben von Patienten  
mit oralem Plattenepithelkarzinom**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2022**

vorgelegt von Dr. med. dent. Ann-Kristin Struckmeier  
geboren am 16.10.1997 in Lüneburg

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael Menger

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kolja Freier
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Schick
3. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Andrea Rau (Greifswald)

## Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Struckmeier AK, Radermacher A, Fehrenz M, Bellin T, Alansary D, Wartenberg P, Boehm U, Wagner M, Scheller A, Hess J, Moratin J, Freudlsperger C, Hoffmann J, Thurner L, Roemer K, Freier K, Horn D. IDO1 is highly expressed in macrophages of patients in advanced tumour stages of oral squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2022 (Epub ahead of print).

Struckmeier AK, Radermacher A, Fehrenz M, Alansary D, Wartenberg P, Wagner M, Scheller A, Hess J, Moratin J, Freudlsperger C, Hoffmann J, Thurner L, Roemer K, Freier K, Horn D. TREM2 is Associated With Advanced Stages and Inferior Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Cancers 2022;14:4635.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>2. Summary</b>	<b>13</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Orales Plattenepithelkarzinom</b>	<b>16</b>
3.1.1 Epidemiologie	16
3.1.2 Risikofaktoren	16
3.1.3 Pathologie	17
3.1.4 TNM-Klassifikation, UICC-Stadien und Grading	18
3.1.5 Therapieoptionen	21
3.1.6 Prognose	26
<b>3.2 IDO1</b>	<b>27</b>
3.2.1 Grundlagen	27
3.2.2 Isoenzyme	28
3.2.3 Bedeutung in der Tumormunologie und bisherige Therapieansätze	29
3.2.4 Kynurenin/Tryptophan-Ratio (Kyn/Trp-Ratio)	31
<b>3.3 TREM2</b>	<b>32</b>
3.3.1 Grundlagen	32
3.3.2 Bedeutung in der Tumormunologie und bisherige Therapieansätze	33
3.3.3 Soluble TREM2 (sTREM2)	34
<b>3.4 Tumormikroumgebung</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Makrophagen</b>	<b>36</b>
3.5.1 Makrophagenpolarisation	36
3.5.2 Makrophagenmarker	37
3.5.3 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)	38
<b>3.5 Biomarker</b>	<b>39</b>
<b>3.6 Zielsetzung</b>	<b>40</b>
<b>4. Material und Methodik</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Ethikanträge</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Immunhistochemische Färbung</b>	<b>42</b>
4.2.1 Tissue microarrays (TMAs)	42
4.2.2 Durchführung der Immunhistochemie	42
4.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung	44
<b>4.3 Probenakquirierung für FACS und ELISA</b>	<b>46</b>
4.3.1 Rekrutierung der Tumor- und Kontrollpatienten	46
4.3.2 Entnahme von Blutproben	47
4.3.3 Ficoll-Isolierung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	47

4.3.4 Verarbeitung des Serums	48
4.3.5 Dissoziation von Gewebeproben	48
4.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	49
4.3.7 Kryokonservierung und Auftauen von PBMCs	49
<b>4.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)</b>	<b>50</b>
4.4.1 Grundlagen	50
4.4.2 Färbung, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen	53
<b>4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</b>	<b>55</b>
4.5.1 Grundlagen	55
4.5.2 Durchführung des Tryptophan-ELISAs	57
4.5.3 Durchführung des Kynurenin-ELISAs	58
4.5.4 Durchführung des sTREM2-ELISAs	58
4.5.5 Konzentrationsberechnungen der spektralphotometrisch analysierten Proben	59
<b>4.6 Statistische Analyse der klinischen und histopathologischen Daten</b>	<b>59</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur IDO1-Expression</b>	<b>61</b>
5.1.1 IDO1-Expression in Primärtumoren	64
5.1.2 IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen	77
<b>5.2 FACS-Analyse zur IDO1-Expression</b>	<b>89</b>
5.2.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorpatientenkohorte	90
5.2.2 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen der Tumor- und Kontrollpatientenkohorte	93
5.2.3 Postoperativer Verlauf der IDO1-Expression	96
5.2.4 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe	97
<b>5.3 ELISAs der Kynurenin- und Tryptophankonzentration</b>	<b>99</b>
5.3.1 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie deren Ratio im Serum	100
5.3.2 Korrelation der Kynurenin/Tryptophan-Ratio mit der IDO1-Expression in PBMCs und Epithelzellen	102
5.3.3 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie ihre Ratio im postoperativen Verlauf	103
<b>5.4 Immunhistochemische Untersuchungen zur TREM2-Expression</b>	<b>105</b>
5.4.1 TREM2-Expression in Primärtumoren	107
5.4.2 TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen	115
<b>5.5 FACS-Analyse zur TREM2-Expression</b>	<b>123</b>
5.5.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorpatientenkohorte	124
5.5.2 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen der Tumor- und Kontrollpatientenkohorte	127
5.5.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe	130

<b>5.6 ELISA der sTREM2-Konzentration</b>	<b>132</b>
5.6.1 Korrelation der sTREM2-Konzentration im Serum mit klinisch und histopathologischen Charakteristika	133
<b>6. Diskussion</b>	<b>134</b>
<b>6.1 Diskussion der Methodik</b>	<b>134</b>
6.1.1 Immunhistochemie	134
6.1.2 Fluorescence activated cell sorting (FACS)	135
6.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	137
<b>6.2 Diskussion der Ergebnisse zu IDO1</b>	<b>138</b>
6.2.1 IDO1-Expression im Tumor	138
6.2.2 IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen	141
6.2.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und Kontrollpatientenkohorte	142
6.2.4 Postoperativer Verlauf der IDO1-Expression	144
6.2.5 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe	145
6.2.6 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie deren Ratio	146
6.2.7 Korrelation der Kyn/Trp-Ratio mit der IDO1-Expression in PBMCs und tumoralen Epithelzellen	148
6.2.8 Postoperativer Verlauf der Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie ihrer Ratio	149
<b>6.3 Diskussion der Ergebnisse zu TREM2</b>	<b>150</b>
6.3.1 TREM2-Expression im Tumor	151
6.3.2 TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen	153
6.3.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und Kontrollpatientenkohorte	154
6.3.4 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe	155
6.3.5 sTREM2-Konzentration	158
<b>6.4 Schwächen und Stärken der Arbeit</b>	<b>160</b>
<b>6.5 Schlussfolgerung</b>	<b>162</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>163</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>193</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>196</b>
<b>10. Tabellarischer Anhang</b>	<b>199</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>202</b>
<b>12. Lebenslauf</b>	<b>203</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	adjacent area = Nachbarbereich
<b>AF647</b>	Alexa Fluor 647
<b>AhR</b>	Arylhydrocarbon-Rezeptor
<b>ANOVA</b>	analysis of variance = Varianzanalyse
<b>APC-Cy7</b>	Allophycocyanin-cyanine dye indotricarbocyanine
<b>BV421</b>	Brilliant Violette 421
<b>CD</b>	cluster of differentiation = Unterscheidungsgruppen
<b>CEA</b>	Carcinoembryonales Antigen
<b>CI</b>	confidence interval = Konfidenzintervall
<b>CPS</b>	combined positive score = kombinierter positiver Score
<b>CTLA-4</b>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein- 4 = zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein
<b>Cyfra 21-1</b>	Cytokeratin 19-Fragment
<b>DAP12</b>	DNAX activating protein of 12 kDa = DNAX-Aktivierungsprotein mit einer Größe von 12 kDa
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
<b>DOI</b>	depth of invasion = Invasionstiefe
<b>E</b>	Enzym
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
<b>ENE</b>	extranodal extension = extranodales Wachstum
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting = Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FMO</b>	fluorescence minus one
<b>FSC</b>	forward side scatter channel = Kanal des Vorwärtsstreulichts
<b>GCN2</b>	general control non-derepressible 2
<b>HNSCC</b>	head and neck squamous cell carcinoma = Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals- Region

<b>HPV</b>	Humanen Papillomaviren
<b>HR</b>	hazard ratio = Risikoquotient
<b>ICI</b>	Immuncheckpointinhibitor
<b>IDO1</b>	Indolamin-2,3-dioxygenase 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Kyn</b>	Kynurenin
<b>Kyn/Trp-Ratio</b>	Kynurenin/Tryptophan-Ratio
<b>M</b>	Mol
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>min</b>	Minute(n)
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>ORR</b>	objective response rate = objektive Ansprechrage
<b>OS</b>	overall survival = Gesamtüberleben
<b>OSCC</b>	oral squamous cell carcinoma = orales Plattenepithelkarzinom
<b>PBMCs</b>	peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
<b>PD-1</b>	programmed cell death protein 1 = programmiertes Zelltodprotein 1
<b>PD-L1</b>	programmed death ligand 1 = Programmierter Todesligand 1
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>RNA</b>	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SCCA</b>	Squamous Cell Carcinoma Antigen = Plattenepithelkarzinom-assoziiertes Antigen
<b>SRC</b>	Spearman's rank correlation coefficient = Spearmans Rangkorrelationskoeffizient
<b>SSC</b>	sideward light scatter chanel = Kanal des Seitwärtsstreulichts
<b>sTREM2</b>	Soluble TREM2 = lösliches sTREM2
<b>S</b>	Substrat
<b>TAM</b>	tumor-associated macrophage = Tumor- assoziierter Makrophage
<b>TDO</b>	Tryptophan-2,3-dioxygenase
<b>TGF</b>	Transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor
<b>TMA</b>	tissue microarray = Gewebechip

<b>TME</b>	tumor microenvironment = Tumormikroumgebung
<b>TNM</b>	tumor, nodus, metastasis = Tumor, Lymphknotenmetastase, Fernmetastase
<b>TREM2</b>	Triggering receptor expressed on myeloid cells type 2
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>TU</b>	Tumor
<b>UICC</b>	Union internationale contre le cancer
<b>W</b>	Waschschrift
<b>1-MT</b>	1-Methyltryptophan

## 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Trotz multimodaler Therapiekonzepte hat die 5-Jahres-Überlebensrate des oralen Plattenepithelkarzinoms (oral squamous cell carcinoma, OSCC) in den letzten Jahrzehnten bei 53,7% stagniert. Das Hauptaugenmerk der aktuellen onkologischen Grundlagenforschung liegt daher auf der Identifizierung tumorspezifischer Marker, die für die Entwicklung von neuen diagnostischen und individualisierten, zielgerichteten therapeutischen Strategien eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Indolamin-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) und Triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM2) beim OSCC untersucht, denen beiden ein hoher Stellenwert in der tumorinitiierter Immunsuppression zugeschrieben wird.

**Methodik:** Im ersten Teil dieser Arbeit erfolgten immunhistochemische Färbungen zum Nachweis der Expression von IDO1 und TREM2 im Tumorgewebe sowie korrespondierenden Lymphknotenmetastasen, um diese auf eine potentielle Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern sowie eine mögliche prognostische Relevanz zu untersuchen. Im zweiten Schritt galt es, Makrophagen auf eine mögliche Expression von IDO1 und TREM2 zu analysieren. Hierfür wurde Tumor- sowie gesundes Nachbargewebe dissoziiert und in Einzelzellsuspensionen überführt sowie periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) isoliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Makrophagenmarker CD68, CD163 und CD206 überprüft. Soluble TREM2 (sTREM2, Shedding- bzw. alternatives Splicingprodukt von TREM2) und die IDO1-Aktivität (gemessen als Kynurenin/Tryptophan-Ratio) wurden als serologisch bestimmbare Tumormarker untersucht.

**Ergebnisse:** Eine hohe epitheliale IDO1-Expression in Primärtumoren zeigte eine signifikante Assoziation mit dem weiblichen Geschlecht (Spearman's rank correlation coefficient (SRC),  $p=0,046$ ), einem Alter  $\leq 75$  Jahre (SRC,  $p=0,017$ ), den niedrigen Union internationale contre le cancer (UICC)-Stadien (SRC,  $p<0,001$ ) sowie dem Auftreten eines Rezidivs (SRC,  $p=0,021$ ).

Eine hohe IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore korrelierte signifikant mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p=0,006$ ), einem Alter  $> 75$  Jahre (SRC,  $p=0,019$ ) sowie hohen UICC-Stadien (SRC,  $p=0,026$ ).

Die IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore zeigte in der Univariat-Analyse einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben (Hazard Ratio (HR): 2,544; 95% confidence interval (9%CI): 1,259-5,139;  $p=0,009$ ) und das Gesamtüberleben (HR: 2,817; 95%CI: 1,428-5,558;  $p=0,009$ ). In der Multivariat-Analyse konnte ein annähernd signifikanter Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit festgestellt werden (HR: 2,073; 95%CI: 0,959-4,479;  $p=0,064$ ). Die IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore wies in der Univariat-Analyse hingegen einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben (HR: 1,483; 95%CI: 1,029-2,137;  $p=0,029$ ) sowie einen annähernd signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben auf (HR: 1,428; 95%CI: 0,985-2,070;  $p=0,054$ ). In der Multivariat-Analyse wurde die IDO1-Expression in Immunzellen als annähernd signifikanter unabhängiger Einflussfaktor auf das progressionsfreie Überleben bestätigt (HR: 1,416; 95%CI: 0,967-2,074;  $p=0,074$ ).

Bei der Auswertung der TREM2-Expression in Immunzellen der Primärtumore zeigte sich, dass diese positiv mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p=0,021$ ), den UICC-Stadien (SRC,  $p=0,040$ ) und der PD-L1-Expression korreliert (SRC,  $p<0,001$ ). Zudem wiesen Patienten mit einer hohen TREM2-Expression signifikant häufiger einen Tumorprogress auf (Multivariat-Analyse, HR: 2,17; 95%CI: 1,021-4,613;  $p=0,044$ ) und zeigten ein signifikant geringeres Gesamtüberleben (Multivariat-Analyse, HR: 2,548; 95%CI: 1,089-5,964;  $p=0,031$ ). Eine hohe TREM2-Expression in Immunzellen von Lymphknotenmetastasen korrelierte mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p=0,008$ ), einem Alter  $> 75$  Jahre (SRC,  $p=0,042$ ) und einer hohen PD-L1-Expression (SRC,  $p<0,001$ ). Die TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen zeigte in der Multivariat-Analyse hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens einen annähernd signifikanten Einfluss (HR: 4,904; 95%CI: 1,003-23,987;  $p=0,050$ ).

Die IDO1- und TREM2-Expression auf Makrophagen der PBMCs nahm mit zunehmendem UICC-Stadium zu und war im Allgemeinen höher als in der Kontrollkohorte.

Der Anteil IDO1-exprimierender Zellen an den CD68<sup>+</sup>- und CD163<sup>+</sup>-Zellen war im Tumorgewebe hochsignifikant höher als im gesunden Nachbargewebe (t-Test,  $p<0,0001$ ). Im Gegensatz dazu konnte ein vergleichbarer IDO1<sup>+</sup>-Anteil der CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe festgestellt werden (t-Test,  $p=0,924$ ). Auch die Anteile TREM2-exprimierender Immunzellen waren zwischen Tumor- und Nachbargewebe vergleichbar (t-Test,  $p>0,05$ ).

Die Kynurenin- und Tryptophan-Konzentrationen sowie ihre Ratio unterschieden sich signifikant zwischen Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen (t-Test,  $p<0,05$ ).

Die Kynurenin/Tryptophan-Ratio korrelierte signifikant mit der IDO1-Expression der PBMCs (SRC,  $p < 0,05$ ).

Die sTREM2-Konzentration korrelierte mit dem Fortschritt der malignen Erkrankung, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (SRC, UICC-Stadium:  $p = 0,059$ ).

**Schlussfolgerung:** IDO1 und TREM2 konnten als Biomarker des OSCCs verifiziert werden und könnten im Rahmen der Therapieindividualisierung (personalisierte Medizin) zur Therapiestratifizierung und -optimierung beitragen.

Hierbei könnten vor allem Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien von einer gegen die Marker gerichteten Immuntherapie profitieren.

Nach klinischer Revalidierung könnte die Kynurenin/Tryptophan-Ratio (als Surrogat der IDO1-Aktivität) zukünftig zur Therapiestratifizierung von Patienten mit lokoregionär metastasiertem OSCC unter Berücksichtigung individueller Risikoprofile in die Routinediagnostik implementiert werden.

## 2. Summary

**Background:** Despite multimodal therapy concepts, the 5-year survival rate for oral squamous cell carcinoma (OSCC) has stagnated at 53.7% in recent decades. The focus of current oncological basic research is therefore on the identification of tumor-specific markers that can be used for the development of new diagnostic and individualized, targeted therapeutic strategies. In this work, the importance of indolamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM2) in OSCC was investigated, both of which are considered to be of great importance in tumor-initiated immunosuppression.

**Methods:** In the first part of this work, immunohistochemical staining was performed to detect the expression of IDO1 and TREM2 in the tumor tissue and the corresponding lymph node metastases in order to identify a correlation with clinical and histopathological parameters and a potential prognostic relevance. The second step was to investigate a possible expression of IDO1 and TREM2 in macrophages. For this purpose, tumor and healthy adjacent tissue were dissociated and transferred into single cell suspensions, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and then investigated for the expression of the macrophage markers CD68, CD163 and CD206 by flow cytometry. Soluble TREM2 (sTREM2, shedding or alternative splicing product of TREM2) and IDO1 activity (measured as kynurenine/tryptophan ratio) were investigated as serologically determinable tumor markers.

**Results:** Immunohistochemical staining showed that high epithelial IDO1 expression in the primary tumors was significantly associated with female sex (Spearman's rank correlation coefficient (SRC),  $p=0.046$ ), age  $\leq 75$  years (SRC,  $p=0.017$ ), the lower Union international contre le cancer (UICC) stages (SRC,  $p<0.001$ ) and the risk of recurrence (SRC,  $p=0.021$ ).

High IDO1 expression in immune cells of the primary tumors correlated significantly with female sex (SRC,  $p=0.006$ ), age  $> 75$  years (SRC,  $p=0.019$ ), and more advanced UICC stages (SRC,  $p=0.026$ ).

In univariate analysis, IDO1 expression in epithelial cells of the primary tumors showed a significant influence on progression-free survival (hazard ratio (HR): 2.544; 95% confidence interval (95%CI): 1.259-5.139;  $p=0.009$ ) and overall survival (HR: 2.817, 95%CI: 1.428-5.558,  $p=0.009$ ). In the multivariate analysis, it almost reached statistical

significance on the probability of recurrence (HR: 2.073; 95%CI: 0.959-4.479;  $p=0.064$ ). In the univariate analysis, however, IDO1 expression in immune cells of the primary tumors showed a significant influence on progression-free survival (HR: 1.483; 95%CI: 1.029-2.137;  $p=0.029$ ) and an almost significant influence on overall survival (HR: 1.428, 95%CI: 0.985-2.070,  $p=0.054$ ). In multivariate analysis, IDO1 expression was confirmed to be an approximately significant independent factor influencing progression-free survival (HR: 1.416; 95%CI: 0.967-2.074;  $p=0.074$ ).

Analysis of TREM2 expression in immune cells of the primary tumors showed a positive correlation with female gender (SRC,  $p=0.021$ ), UICC stage (SRC,  $p=0.040$ ) and PD-L1 expression (SRC,  $p<0.001$ ). In addition, patients with high TREM2 expression showed significantly increased risk for tumor progression (multivariate analysis, HR: 2.17; 95%CI: 1.021-4.613;  $p=0.044$ ) and showed a significantly lower overall survival (multivariate analysis, HR: 2.548, 95%CI: 1.089-5.964,  $p=0.031$ ). High TREM2 expression in immune cells of lymph node metastases correlated with female gender (SRC,  $p=0.008$ ), age > 75 years (SRC,  $p=0.042$ ), and high PD-L1 expression (SRC,  $p<0.001$ ). In the multivariate analysis, TREM2 expression in immune cells of the lymph node metastases showed an almost significant influence on progression-free survival (HR: 4.904; 95%CI: 1.003-23.987;  $p=0.050$ ).

IDO1 and TREM2 expression on macrophages of the PBMCs increased with increasing UICC stage and was generally higher than in the control cohort.

The proportion of IDO1<sup>+</sup> cells in the CD68<sup>+</sup>- and CD163<sup>+</sup>-cells was significantly higher in the tumor tissue than in the healthy adjacent tissue (t-test,  $p<0.0001$ ). In contrast, a comparable IDO1-expressing proportion of CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-cells could be determined between tumor and healthy adjacent tissue (t-test,  $p=0.924$ ). The proportions of TREM2-expressing immune cells were also comparable between tumor and adjacent tissue (t-test,  $p>0.05$ ).

The kynurenine and tryptophan concentrations as well as their ratio differed significantly between patients with and without lymph node metastases (t-test,  $p<0.05$ ). The kynurenine/tryptophan ratio correlated significantly with the IDO1 expression of the PBMCs (SRC,  $p<0.05$ ).

The sTREM2 concentration correlated with the progression of the malignant disease, but the level of significance was just missed (SRC, UICC stage:  $p=0.059$ ).

**Conclusion:** IDO1 and TREM2 could be verified as biomarkers of OSCC and could be used in the context of therapy individualization (personalized medicine) for therapy stratification and optimization.

Patients in advanced UICC stages in particular could benefit from an immunotherapy targeting IDO1 or TREM2.

After clinical revalidation, the kynurenine/tryptophan ratio (as a surrogate of IDO1 activity) could be implemented in routine diagnostics for therapy stratification of patients with locoregional metastatic OSCC, taking into account individual risk profiles.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Orales Plattenepithelkarzinom

##### 3.1.1 Epidemiologie

Der Anteil des oralen Plattenepithelkarzinoms (oral squamous cell carcinoma, OSCC) an den Malignomen der Mundhöhle beträgt mehr als 90% (Massano et al., 2006). Zudem stellt das OSCC eine der häufigsten Entitäten der Kopf-Hals-Tumore (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) dar.

In der Bundesrepublik Deutschland betrug die Inzidenz von Malignomen der Kopf-Hals-Region im Jahr 2018 ca. 15.000 Neuerkrankungen (Robert Koch-Institut, 2021). Global werden jährlich circa 350.000 Neudiagnosen gestellt (Ferlay et al., 2019; Massano et al., 2006).

In der Bundesrepublik Deutschland handelt es sich beim OSCC um die acht häufigste maligne Neoplasie beim Mann, wohingegen das OSCC bei der Frau die dreizehnhäufigste maligne Neoplasie darstellt. Die Inzidenz beim männlichen Geschlecht ist seit drei Jahrzehnten leicht rückläufig, wohingegen sie beim weiblichen Geschlecht zunehmend ansteigt. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Folgen des rückläufigen Konsums von Tabak und Alkohol durch Männer und den steigenden Abusus durch Frauen zurückzuführen (Johnson et al., 2020).

Mehr als 80% der OSCC werden zwischen dem fünften und achten Lebensjahrzehnt diagnostiziert (Krolls et Hoffman, 1976), wobei Männer im Durchschnitt früher als Frauen erkranken (59 vs. 65 Jahre; Wolfer et al., 2022).

##### 3.1.2 Risikofaktoren

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines OSCC sind in der westlichen Welt der Tabakkonsum sowie der chronische Alkoholabusus, wobei diese synergistisch wirken (Mello et al., 2019). Das Risiko der Entstehung eines OSCC steigt hierbei in Abhängigkeit von der Dauer und Quantität des Konsums. Die Kombination beider Noxen kann das Lebenszeitrisiko für die Entstehung eines OSCC auf das 35-fache erhöhen (Dal Maso et al., 2016).

Im Bereich des indischen Subkontinents und Südostasiens beträgt der Anteil des OSCCs an allen Malignomen 30 bis 40% (Sharma et al., 2019). Die damit im Vergleich zur westlichen Welt deutlich erhöhte Prävalenz lässt sich auf den habituellen Konsum der Betelnuss (mit der Folge einer oralen submukösen Fibrose als prämaligne Kondition mit einer Transformationsrate von 8 bis 15% innerhalb von 10 bis 15 Jahren; Zain et al., 1999) und das reverse smoking (Hebert et al., 2002) zurückführen.

Neben diesen Hauptrisikofaktoren gibt es eine Reihe anderer Einflussparameter, die eine synergistische Rolle bei der Entwicklung des OSCCs und seiner Vorstufen spielen. Als prädisponierende Faktoren werden eine mangelhafte Mundhygiene (Hashim et al., 2016), Malnutrition (u.a. auch in Form eines Plummer-Vinson-Syndroms (Vigneswaren et al., 2014), Vitamin A- oder Vitamin C-Mangel), genetische Faktoren (z.B. Li-Fraumeni-Syndrom, Fanconi-Anämie (Friedlander, 2001; Kutler et al., 2003; Vigneswaren et al., 2014;)) und chronische mechanische Irritationen, etwa durch schlechtsitzenden Zahnersatz oder scharfe Zahnkanten (Gupta et al., 2021) diskutiert.

Eine Vielzahl prospektiver und retrospektiver Studien hat sich mit der ätiologischen Bedeutung und dem prognostischen Stellenwert von Humanen Papillomaviren (HPV) beim OSCC beschäftigt. Castellsagué et al. konnten in einer multizentrischen Studie mit 1264 Teilnehmern einen simultanen Nachweis von HPV-Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA), -Onkogen-messenger- Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, mRNA; E6/E7) und p16 bei nur 3% der Patienten feststellen. Insgesamt spielt der HPV-Status beim OSCC somit als prognostischer Faktor zum heutigen Zeitpunkt keine Rolle (Castellsagué et al., 2016).

### 3.1.3 Pathologie

Das OSCC stellt das häufigste Malignom der Mundhöhle dar. Deutlich seltenere Entitäten sind Sarkome (Pandey et al., 2000), Lymphome (Silva et al., 2016), Melanome (Aloua et al., 2021) sowie Basalzellkarzinome (Del Rosario et al., 2001).

Das Plattenepithelkarzinom ist als invasive epitheliale Neoplasie mit einem variablen Grad an Entdifferenzierung definiert (Anneroth et al., 1987; Broders et al., 1920).

Am häufigsten tritt das OSCC im Bereich des Mundbodens und der Zunge auf, gefolgt vom Alveolarfortsatz und der Gingiva. Noch seltener ist das OSCC im Bereich des

Gaumens, der Wangenschleimhaut (Planum buccale) und der Lippen lokalisiert (Sundermann et al., 2018).

Das OSCC ist durch eine frühe Invasion in die umgebenden Lymphgefäße mit der Folge der Ausbildung von lokoregionären (d.h. zervikalen) Lymphknotenmetastasen gekennzeichnet. Bei ca. 40% der Patienten mit primärem OSCC liegen zum Zeitpunkt der Tumorresektion mit Neck Dissection zervikale Lymphknotenmetastasen vor (Laimer et al., 2020). Zu beachten ist hierbei, dass bei bis zu 33% der Patienten eine okkulte (d.h. weder klinisch noch radiologisch nachweisbare) regionäre Metastasierung vorliegt (De Zinis et al., 2006; Yuen et al., 2002).

Eine hämatogene Tumorausbreitung ist deutlich seltener und führt in erster Linie zu einer pulmonalen bzw. später auch hepatischen Metastasierung (Liu et al., 2019).

#### 3.1.4 TNM-Klassifikation, UICC-Stadien und Grading

Das OSCC wird anhand der TNM (tumor, nodus, metastasis)-Klassifikation eingeteilt. Die achte Auflage der TNM-Klassifikation ist in den Tabellen 1 bis 3 dargestellt (Amin et al., 2017).

Die T-Klassifikation beschreibt die Größe des Primärtumors, eine ggf. vorhandene Infiltration von Nachbarstrukturen sowie die Invasionstiefe (depth of invasion, DOI).

Die N-Klassifikation beschreibt die Ausdehnung der regionären Lymphknotenmetastasierung sowie ein ggf. vorhandenes extranodales Wachstum von Lymphknotenmetastasen (extranodal extension, ENE).

Die M-Klassifikation beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Es wird zwischen der klinischen bzw. prätherapeutischen (cTNM) und der postoperativen histopathologischen (pTNM) TNM-Klassifikation unterschieden. Im Falle eines Rezidivs wird der TNM-Klassifikation ein r (rTNM), im Falle einer Autopsie ein a (aTNM) und bei neoadjuvanter Therapie ein y (yTNM) vorangestellt.

In der histopathologischen Klassifikation werden das Grading (G), die vaskuläre (V) und lymphogene Ausbreitung (L), die Perineuralscheideninfiltration (Pn) sowie der Resektionsstatus (R) ergänzt.

Auf Grundlage der TNM-Klassifikation lässt sich jeder Tumor einem UICC-Stadium (Union internationale contre le cancer) zuweisen (siehe Tabelle 4; Amin et al., 2017). Die UICC-Stadien dienen der Einteilung der betroffenen Patienten in möglichst homogene Gruppen, um eine Aussage bezüglich des Krankheitsverlaufs und der Prognose treffen zu können.

Das Grading beschreibt den Grad der Entdifferenzierung (siehe Tabelle 5), d.h. die Umwandlung von normalen, vollständig differenzierten Zellen des unverhornten Plattenepithels der Mundhöhle in weniger differenzierte, dysplastische Zellen bis hin zu undifferenzierten, anaplastischen Zellen.

**Tabelle 1:** T-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)

T-Klassifikation (Primärtumor)	Definition
<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Größte Tumorausdehnung $\leq 2$ cm, DOI $\leq 5$ mm
<b>T2</b>	Größte Tumorausdehnung $\leq 2$ cm, DOI $>5$ mm und $\leq 10$ mm ODER Tumor $>2$ cm aber $\leq 4$ cm und DOI $\leq 10$ mm
<b>T3</b>	Größte Tumorausdehnung $>4$ cm ODER jeder Tumor DOI $>10$ mm
<b>T4</b>	Infiltration von Nachbarstrukturen

Abkürzung: DOI = depth of invasion

**Tabelle 2:** N-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)

<b>N-Klassifikation (regionäre Lymphknotenmetastasen)</b>	<b>Definition</b>
<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten bis 3 cm und ENE(-)
<b>N2a</b>	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten bis 3 cm und ENE(+) oder Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten 3 bis 6 cm und ENE(-)
<b>N2b</b>	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE(-)
<b>N2c</b>	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, nicht größer als 6 cm und ENE(-)
<b>N3a</b>	Metastase in solitärem Lymphknoten größer als 6 cm und ENE(-)
<b>N3b</b>	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten größer 3 cm und ENE(+) ODER Metastase in multiplen ipsilateralen, kontralateralen ODER bilateralen Lymphknoten, davon mindestens eine ENE(+) ODER Metastase in einem solitären kontralateralen Lymphknoten, 3 cm oder kleiner und ENE(+)

Abkürzung: ENE = extranodal extension

**Tabelle 3:** M-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)

<b>M-Klassifikation (Fernmetastasen)</b>	<b>Definition</b>
<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastase(n)

**Tabelle 4:** UICC-Stadien des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)

UICC-Stadien	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
<b>IVA</b>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVB</b>	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
<b>IVC</b>	Jedes T	Jedes N	M1

Abkürzung: UICC = Union internationale contre le cancer

**Tabelle 5:** Grading des oralen Plattenepithelkarzinoms

Grading	Definition
<b>Gx</b>	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
<b>G1</b>	Gut differenziert
<b>G2</b>	Mäßig differenziert
<b>G3</b>	Schlecht differenziert
<b>G4</b>	Undifferenziert

Modifiziert nach Amin et al., 2017.

### 3.1.5 Therapieoptionen

#### 3.1.5.1 Allgemeine Therapieprinzipien

Im Allgemeinen erfolgt die Wahl der Therapie in Abhängigkeit von der Größe und Lage des Primärtumors, dem Allgemeinzustand des Patienten, der voraussichtlichen behandlungsbedingten Morbidität mit den möglichen funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen sowie dem voraussichtlichen Behandlungserfolg. Die Wahl der Therapie sollte heutzutage innerhalb einer interdisziplinären Tumorkonferenz getroffen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Die drei Säulen der kurativ intendierten Behandlung des OSCCs sind:

- die alleinige chirurgische Therapie (Resektion des Tumors und mindestens eine ipsilaterale selektive Lymphknotenausräumung (Neck Dissection) der zervikalen Level I-III),
- die alleinige Strahlentherapie (Radiatio)
- sowie deren Kombination mit oder ohne Chemotherapie.

Der Goldstandard in der Therapie des OSCCs ist die radikale Resektion mit sofortiger Rekonstruktion in Kombination mit einer Neck Dissection. Bei Vorliegen von Risikofaktoren (knappe oder positive Resektionsränder, T3- und T4-Tumore, Lymphknotenbefall, perineurale oder Gefäßinvasion) sollte zusätzlich eine adjuvante Therapie (in Form einer Radiatio) durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Das lokoregionäre Tumorrezidiv ist der häufigste Grund für eine erfolglose primäre Behandlung und ein in der Folge tumorbedingtes Versterben. Als kurativ intendierte therapeutische Optionen stehen im Falle eines resektablen Rezidivs eine erneute Operation (Salvage-Operation) und/ oder eine Radio- oder Radiochemotherapie zur Auswahl. Bei der Wahl der Therapie sollten der Fortschritt des Tumorrezidivs und seine potentielle Resektabilität, die vorausgegangene Therapie, die wahrscheinliche Effektivität der Therapie in Abwägung ihrer Risiken sowie der Allgemeinzustand des Patienten Berücksichtigung finden. Letztlich sollte bei der Entscheidungsfindung auch eine palliative Therapie erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Die Patienten mit einem inkurablen OSCC, die sich jedoch in einem guten Allgemeinzustand befinden, werden einer systemischen Therapie zugeführt.

Hierbei stellte das EXTREME-Schema lange Zeit die Erstlinientherapie dar. Im Rahmen des EXTREME-Schemas erfolgt eine platinbasierte Chemotherapie (vorzugsweise Cisplatin) in Kombination mit Cetuximab sowie ggf. 5-Fluoruracil (Vermorken et al., 2008). Cisplatin sowie 5-Fluoruracil gehören zu den klassischen Zytostatika/Chemotherapeutika. Der Platinkomplex-Bildner Cisplatin bewirkt eine Querverknüpfung von DNA-Strängen und somit die Hemmung der DNA-Replikation (Sherman et al., 1985). Bei 5-Fluoruracil handelt es sich um einen Antimetaboliten, d.h. um einen den Pyrimidinbasen ähnlichen Wirkstoff, welcher durch seinen Einbau in die RNA das Zellwachstum hemmt (Rutman et al., 1985; Thomas et Zalcborg, 1998). Die Anwendung der Zytostatika beruht auf der Annahme, dass

Tumorzellen eine höhere Replikationsrate als normale Zellen aufweisen und deswegen anfälliger für die Wirkung eines Zytostatikums sind.

Im Gegensatz zur chirurgischen Therapie und zur Radiatio wirkt das Chemotherapeutikum nicht nur lokal, sondern zirkuliert durch den Körper und kann somit auch Krebszellen im gesamten Körper angreifen. Jedoch weisen auch einige normale Körperzellen, wie bspw. Knochenmarkzellen, eine hohe Replikationsrate auf und sind damit Ziel der unspezifischen Wirkweise von Chemotherapeutika. Deshalb sind bei Chemotherapien oft unerwünschte systemische Nebenwirkungen zu verzeichnen. Zudem weisen viele Tumorzellen bereits zu Beginn der Behandlung eine primäre Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika auf oder erwerben im Verlauf der Behandlung eine sekundäre Resistenz, welche zum Versagen der Therapie und folglich zum Tumorprogress führen können (Liang et al., 2010).

Im Gegensatz dazu kommt Cetuximab im Rahmen der targeted therapy zum Einsatz. Cetuximab ist gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR) gerichtet und greift hierdurch gezielt in die molekularpathologischen Vorgänge von entarteten Zellen ein (Huang et Harari, 1999).

Seit dem Jahr 2020 stellt ein weiterer Wirkstoff der Targeted Therapy, Pembrolizumab, nach der nationalen Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft die Erstlinientherapie bei Patienten mit einem inkurablem OSCC dar. Bei Pembrolizumab handelt es sich um einen gegen den programmed cell death protein 1 (PD-1)-Rezeptor gerichteten Antikörper. Die Voraussetzung für die Anwendung ist, dass eine intratumorale Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)-Expression nachgewiesen werden kann (combined positive score (CPS), d.h. PD-L1-Expression auf Tumorzellen und Immunzellen  $\geq 1$ ).

Durch die Food and Drug Administration (FDA) ist auch Nivolumab als PD-1-Antikörper nach bereits erfolgter platinbasierter Chemotherapie (d.h. im Falle eines Rezidivs oder Tumorprogresses) zugelassen, dieser hat jedoch noch keinen Einzug in die nationale Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft erhalten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

### 3.1.5.2 Immuncheckpointinhibitoren (ICIs)

Tumorzellen bedienen sich inhibitorischer Immuncheckpoints mit dem Ziel der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (sog. Immunevasion). Die zuvor bereits erwähnten Antikörper Cetuximab, Pembrolizumab und Nivolumab gehören zu den sog. Immuncheckpointinhibitoren (ICIs), welche mehrheitlich durch die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems, hierbei v.a. von tumorspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten wirken (Twomey et Zhang, 2021).

Der seit 2006 (für lokoregionäre Rezidive des HNSCCs und nach Versagen der platinbasierten Chemotherapie; U.S. Food and Drug Administration, 2006) bzw. 2011 (als Erstlinientherapie im Rahmen des EXTREME-Schemas für lokoregionäre und metastasierte HNSCC; U.S. Food and Drug Administration, 2011) durch die FDA zugelassene Antikörper Cetuximab ist gegen den EGFR gerichtet, welcher Vorgänge des Zellwachstums und der Apoptose reguliert und nach Ligandenbindung u.a. zur Aktivierung verschiedener onkogener Signalwege führt. Der EGFR wird in Tumorgewebe häufig überexprimiert. Hierbei ist eine hohe Expression im Tumorgewebe mit einem kürzeren Überleben assoziiert (Costa et al., 2018). Vermorken et al. beobachteten, dass sich im Rahmen einer palliativen Therapie durch die Zugabe von Cetuximab zu Cisplatin und 5-Fluoruracil (im Rahmen des EXTREME-Schemas) das mediane progressionsfreie Überleben von 3,4 auf 5,6 Monate sowie das mediane Gesamtüberleben von 7,4 auf 10,1 Monate verbesserte. Die Ansprechrate verbesserte sich durch die additive Gabe von Cetuximab zur konventionellen Chemotherapie zudem von 20 auf 36% (Vermorken et al., 2008).

Durch die Zulassung der PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizuma durch die FDA in dem Jahr 2016 konnten im Bereich der Immunonkologie des HNSCCs vielversprechende Therapieansätze etabliert werden (U.S. Food and Drug Administration, 2016). Tumorzellen exprimieren vielfach PD-L1 und binden hiermit an den PD-L1-Rezeptor auf zytotoxischen T-Lymphozyten, deren Aktivierung hierdurch gehemmt wird. Der darauffolgende inhibierende Signalweg verhindert die Erkennung des Tumors durch das Immunsystem (Pardoll, 2012).

Eine Übersicht über die zurzeit im Rahmen der Targeted Therapy eingesetzten Antikörper bietet Tabelle 6.

**Table 6:** Übersicht über die zurzeit bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms eingesetzten Immuncheckpointinhibitoren

Antikörper	Target	Studien
<b>Cetuximab</b>	EGFR	EXTREME Studie: Cetuximab plus eine platinbasierte Chemotherapie als Erstlinientherapie konnten das OS der Patienten mit Rezidiv oder Metastasen verbessern (HR: 0,80; 95%CI:0,64-0,99; p=0,04) (Vermorken et al., 2008)
<b>Nivolumab</b>	PD-1	CheckMate 141 Studie: Nivolumab als Monotherapie konnte bei therapierefraktären Patienten im fortgeschrittenen Stadium das OS verbessern (HR: 0,70; 95%CI: 0,51-0,96; p=0,01) (Ferris et al., 2016)
<b>Pembrolizumab</b>	PD-1	KEYNOTE-040 Studie: Nivolumab als Monotherapie konnte bei therapierefraktären Patienten im fortgeschrittenen Stadium das OS verbessern (HR: 0,80; 95%CI: 0,65-0,98; p=0,02); KEYNOTE-048 Studie: Pembrolizumab plus eine platinbasierte Chemotherapie als Erstlinientherapie bei PD-L1 <sup>+</sup> -Patienten im fortgeschrittenen Stadium konnten das OS der Patienten verlängern (HR für CPS ≥ 20: 0,60; 95%CI: 0,45-0,82; p=0,0004; HR für CPS ≥ 1: 0,65; 95 CI%: 0,53-0,80;p<0,0001) (Cohen et al., 2019; Burtness et al., 2019)

Modifiziert nach Chen et al., 2021.

Abkürzungen: CI = confidence interval; CPS = combined positive score; EGFR = epidermal growth factor receptor; HR = hazard ratio; OS = overall survival; PD-1 = programmed cell death protein 1

Generell können die im Rahmen der Targeted Therapy eingesetzten Antikörper durch zwei verschiedene Mechanismen zur Reduktion der Tumormasse beitragen: Entweder interferieren sie direkt mit onkogenen Signalwegen und inhibieren diese oder sie wirken indirekt durch die Aktivierung des Immunsystems. Die direkte Wirkung von Antikörpern kann bspw. durch die Auslösung der Apoptose, eine Inhibition der Tumorphiliferation, die Blockade von Signalkaskaden, eine beschleunigte Rezeptorinternalisierung oder durch die Blockierung der Angiogenese erfolgen (Ben-Kasus et al., 2007). Insgesamt stellt der Target-spezifische Ansatz in der Theorie eine ideale Therapie dar, da er ausschließlich den Tumor, normale gesunde Körperzellen jedoch nicht bekämpft. Diese Tumorspezifität ermöglicht - zumindest theoretisch - im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine Reduktion der Nebenwirkungsprofile.

Ein Nachteil der zielgerichteten Tumorthapeutika ist die Resistenzentwicklung der malignen Zellen (Jenkins et al., 2018). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Behandlung mit ICIs ist ihre geringe Ansprechrate. Die Gründe hierfür sind u.a. die fehlende Immunogenität mancher Tumoren (Jenkins et al., 2018; Le et al., 2017) oder auch die tumorinitiierte Immunsuppression in der Tumormikroumgebung (tumor microenvironment,

TME; Bai et al., 2017; Dammeijer et al., 2017; Dannenmann et al., 2013; Jahchan et al., 2019).

Auch konnte noch kein zielgerichtetes Therapeutikum entwickelt werden, welches absolut tumorspezifisch ist (sog. Off-Target Toxizität gegenüber normalen Zellen). Somit bringt auch diese Therapieform unterschiedliche Nebenwirkungen (häufig bei den PD-L1-Inhibitoren u.a. Fatigue, Kopfschmerzen, Arthralgien, Exanthem, Pruritis, Pneumonitis, Diarrhö, Colitis, Hepatitis, Endokrinopathie) mit sich (Martins et al., 2019).

### 3.1.6 Prognose

Slieker et al. zeigten in einer Metaanalyse, dass die 5-Jahres-Überlebensrate des OSCCs bei 53,7% liegt (Slieker et al., 2022). Hierbei weisen Frauen eine etwas bessere Prognose auf (Abrahão et al., 2020). Dies liegt darin begründet, dass das OSCC heutzutage bei Frauen noch zu einem geringeren Anteil Noxen-getriggert auftritt und zudem auch häufiger in einem frühen UICC-Stadium (I und II) diagnostiziert wird. Bemerkenswert ist, dass die Überlebensraten trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten in den vergangenen 50 Jahren stagniert haben (Bray et al., 2018; Jemal et al., 2011; Torre et al., 2012)

Der Resektionsstatus sowie die Lymphknotenmetastasierung stellen die wichtigsten Prognoseparameter des OSCCs dar. Im Falle einer R0-Resektion (Entfernung des Tumors im Gesunden, mikroskopisch tumorfreie Ränder  $\geq 5$  mm) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 76%, bei einer close-margin-Resektion (weniger als 5 mm mikroskopisch tumorfreie Ränder) bei 56%, bei einer high-risk-margin-Resektion (weniger als 1 mm mikroskopisch tumorfreie Ränder) bei 41% und im Falle einer R1-Resektion (makroskopisch wurde der Tumor entfernt, mikroskopisch sind Tumorzellen noch nachweisbar) bei nur 19% (Hakim et al., 2021).

Lymphknotenmetastasen liegen bei ca. 40% der Patienten sind bereits bei der Erstdiagnose vor (Okura et al., 2009). Das Vorliegen von lokoregionären Lymphknotenmetastasen reduziert das Überleben der Patienten signifikant (Amit et al., 2013).

Das lokoregionäre Tumorrezidiv ist der häufigste Grund für eine erfolglose primäre Behandlung und ein in der Folge tumorbedingtes Versterben. Zittel et al. konnten im frühen Stadium eine Rezidivrate von 22% beobachten (Zittel et al., 2022). In fortgeschrittenen

UICC-Stadien liegen die Rezidivraten bei 40 bis 60% (Forastiere et al., 2003; Pignon et al., 2000).

Die Entstehung des OSCCs wird v.a. durch noxenbedingte Veränderungen der Mukosa induziert, welche im Sinne einer Feldkanzerisierung die gesamte Mukosa des Aerodigestivtraktes betreffen können. Hierdurch besteht das Risiko eines syn- oder metachronen Zweitkarzinoms (Mroueh et al., 2020). Petersen et al. beobachteten bei 23% der OSCC-Patienten nach einem medianen Nachsorgezeitraum von 8,9 Jahren ein metachrones Zweitkarzinom (Petersen et al., 2022).

## **3.2 IDO1**

### 3.2.1 Grundlagen

Das intrazelluläre Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) nimmt eine Schlüsselposition im Tryptophan (Trp)-metabolismus ein (Yamamoto et Hayaishi, 1967) und stellt einen wesentlichen Regulationsmechanismus dar, der zur Immuntoleranz verschiedener Gewebearten beiträgt (Fallarino et al., 2006; Hou et al., 2007; Metz et al., 2007; Muller et al., 2007; Munn et Mellor, 2007).

Es katalysiert den initialen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des oxidativen Katabolismus von Verbindungen, die Indolringe enthalten, darunter Trp und 5-Hydroxytryptamin (5-HAT, Serotonin) zu Kynurenin (Kyn; Carlin et al., 1989).

Das immunregulatorische Potential von IDO1 wurde erstmals 1998 in einer wegweisenden Arbeit von Munn et al. im Mausmodell gezeigt. Die Behandlung von schwangeren Mäusen mit dem IDO1-Blocker 1-D,L-Methyl-Tryptophan resultierte in einem Abort, welcher vermutlich durch eine T-Zell-vermittelte Abstoßung des (semi-)allogenen Embryos hervorgerufen wurde. Munn et al. identifizierten IDO1 daraufhin als wesentlichen Mechanismus des fetalen Schutzes gegen eine mütterliche Immunabstoßung (Munn et al., 1998).

Neben der Hemmung der fetalen Abstoßungen spielt IDO1 eine Rolle in vielen weiteren Vorgängen. Eine Hochregulierung des IDO1-Gens kann u.a. während einer Infektion (Schmidt et al., 2014), nach Transplantation (Brandacher et al., 2007), bei

Autoimmunerkrankungen (Scott et al., 2009) und in Malignomen (Musajo et al., 1964) beobachtet werden.

IDO1 wird hauptsächlich von drei verschiedenen Zelltypen exprimiert: von myeloiden Zellen, v.a. Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen, sowie Endothelzellen und Tumorzellen (Théate et al., 2015).

Insgesamt moduliert und unterstützt IDO1 eine immunsuppressive Umgebung über zwei wesentliche Mechanismen: 1. eine Trp-Depletion und einen damit einhergehenden Trp-Mangel und 2. eine Akkumulation von Trp-Abbauprodukten (v.a. Kyn). Beide Mechanismen führen zu einer Suppression der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Belladonna et al., 2007).

Ein Abfall der Trp-Konzentration führt u.a. zu einem Anstieg an unbeladener Transfer-RNA (tRNA). Dieser resultiert wiederum in einer vermehrten Aktivierung der Stresskinase general control non-derepressible 2 (GCN2). Die vermehrte Aktivität der GCN2 kann letztlich in Zellzyklusarrest, T-Zell-Proliferationshemmung und Apoptose von natürlichen Killer (NK)-Zellen enden (Fallarino et al., 2006; Munn et al., 2005).

Im Gegensatz dazu ist Kyn ein Ligand des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR). Die AhR-Kyn-Interaktion führt zu einer Differenzierung von T-Effektor-Zellen zu regulatorischen T-Lymphozyten und einer veränderten Immunogenität von dendritischen Zellen (Opitz et al., 2011; Mezrich et al., 2010). Insgesamt wird hierdurch die Immunbalance zu mehr regulatorischen T-Lymphozyten und weniger zytotoxischen T-Lymphozyten und somit in Richtung Immuntoleranz verschoben (Jasperson et al., 2008; Puccetti et al., 2007).

### 3.2.2 Isoenzyme

Neben IDO1 existieren die Isoenzyme IDO2 (Ball et al., 2007) und Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO; Kotake et Masayama, 1936). IDO2 wurde 2007 erstmals beschrieben (Ball et al., 2007). Die Bedeutung von IDO2 ist jedoch in weiten Teilen noch ungeklärt. Aufgrund weitverbreiteter genetischer Polymorphismen scheint das Enzym im Gegensatz zu IDO1 jedoch eine geringere katalytische Aktivität aufzuweisen und somit eine eher untergeordnete Rolle im Trp-Metabolismus zu spielen (Metz et al., 2007). Die TDO ist im Gegensatz zu IDO1 und IDO2 substratspezifisch und katalysiert ausschließlich die Umwandlung von L-Trp. Sie wird größtenteils in der Leber exprimiert und ihre Kernaufgabe

besteht darin, die systemische Trp-Konzentration aufrechtzuerhalten (Badawy, 2017; Cervenka et al., 2017).

### 3.2.3 Bedeutung in der Tumorimmunologie und bisherige Therapieansätze

Nach der initialen Beschreibung durch Munn et al. folgten zahlreiche Studien, die sich mit der immunmodulierenden Rolle von IDO1 in Tumoren beschäftigten.

Eine Überexpression von IDO1 im tumoralen Gewebe im Gegensatz zum Normalgewebe wurde in Endometrium- (Théate et al., 2015), Ovarial- (Inaba et al., 2009), Zervix- (Théate et al., 2015) und Nasopharynxkarzinomen (Ben-Haj-Ayed et al., 2016) sowie Melanomen (Théate et al., 2015), aber auch in Tumoren des Gastrointestinaltraktes wie dem Ösophagus-, Magen- und kolorektalen Karzinom (Théate et al., 2015) beschrieben. Hierbei war eine hohe IDO1-Expression im Tumor oder peritumoralen Stroma mit einem verringerten Gesamtüberleben bzw. progressionsfreien Überleben assoziiert. Im Gegensatz dazu gab es auch Studien, die eine genau gegensätzliche Korrelation aufzeigten. So beschrieben Riesenberg et al. ein verbessertes Gesamtüberleben bei Nierenzellkarzinom-Patienten mit einer hohen IDO1-Expression (Riesenberg et al., 2007). Auch in einer Studie von Ishio et al. an hepatozellulären Karzinomen wiesen Patienten mit einer hohen IDO1-Expression ein verbessertes progressionsfreies Überleben auf (Ishio et al., 2004).

Die zuvor aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es eine gewisse Korrelation zwischen der tumoralen IDO1-Expression und dem Überleben zu geben scheint, die exakte Bedeutung von IDO1 ist jedoch noch unklar.

Eine Vielzahl von Tumoren exprimiert IDO1 und scheint auf diese Weise der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen. Folglich scheint eine Inhibition von IDO1 ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer, gezielter Immuntherapien zu sein.

Uyttenhove et al. postulierten, dass die Blockade der IDO1-Aktivität durch die Gabe des pharmakologischen IDO1-Inhibitors 1-Methyltryptophan (1-MT) zu einem verringerten Tumorwachstum führt (Uyttenhove et al., 2003). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Friberg et al., welche bei Mäusen nach Injektion von LLC-Zellen (Lewis lung carcinoma-Zellen; Zelllinie eines epidermoiden Lungenkarzinoms) und Gabe des IDO1-Inhibitors 1-

MT eine geringere Tumorpherifation und zudem eine gesteigerte T-Zell-Aktivität beobachteten (Friebert et al., 2002).

Der erste in klinischen Studien verwendete IDO1-Inhibitor war Indoximod (Wirkstoff: 1-MT). Indoximod zeigte in einer Phase-I-Studie mit 48 Patienten mit therapierefraktären, fortgeschrittenen Malignomen eine gute Verträglichkeit. Zudem wurden fünf Fälle mit einem stable disease von mehr als sechs Monaten beobachtet (Soliman et al., 2016).

Ein weiterer, oral verfügbarer IDO1-Inhibitor ist Epacadostat. Epacadostat erhöhte in vitro die T- und NK-Zellproliferation sowie die Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion und unterdrückte andererseits die regulatorischen T-Lymphozyten. Zudem unterdrückte Epacadostat in vivo auch das Tumorwachstum bei immunkompetenten, jedoch nicht bei immundefizienten Mäusen (Liu et al., 2010). Als Monotherapeutikum zeigte Epacadostat in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit soliden Tumoren in Analogie zu Indoximod als bestes Ergebnis lediglich ein stable disease bei 18 von 52 Patienten (Beatty et al., 2017).

Da der Einsatz der beiden IDO1-Inhibitoren Indoximid und Epacadostat als Monotherapeutika zu überschaubaren Ergebnissen ohne vollständigen Tumorregress führte, konzentrierten sich weitere Studien auf die Kombination eines IDO1-Inhibitors mit bereits etablierten Therapeutika, um diese auf ihren potenziell synergistischen Wert zu untersuchen. Vor allem ICIs, welche gegen PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab), PD-L1 (Atezolizumab) und cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4, Ipilimumab) gerichtet sind, dienten hierbei als Cotherapeutika.

Die Kombination von Indoximod und Pembrolizumab bei Melanompatienten führte zu einer ebenso guten Remissionsrate wie die bereits etablierten Wirkstoffe Nivolumab und Ipilimumab. Im Gegensatz zu dem bereits etablierten Therapieregime zeigten sich jedoch weniger Nebenwirkungen (Zakharia et al., 2018).

In einer anderen Phase-II-Studie bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom führte die Anwendung von Indoximod nach Impfung der Patienten mit Sipuleucel-T (Impfstoff gegen dendritische Zellen) zu einer zweifachen Verlängerung des Gesamtüberlebens (Jha et al., 2017).

Die Kombination von Epacadostat mit ICIs im Rahmen der ECHO 202 und 204 Studien klang zunächst erfolgversprechend: Patienten mit unterschiedlichen Arten von Karzinomen zeigten in der Kombination eines ICIs mit Epacadostat bessere Überlebensraten und weniger Nebenwirkungen als in der singulären Anwendung eines

ICIs (Mitchell et al., 2018; Daud et al., 2018). Die erste große Phase-III-Studie, ECHO 301, zeigte jedoch, dass Epacadostat bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom als Cotherapeutikum zu Pembrolizumab keinen wesentlichen Vorteil mit sich brachte (Muller et al., 2019). Daraufhin wurde der Großteil der klinischen Studien abgebrochen (American Association of Cancer Research, 2018).

Im November 2017 wurde eine neue Phase-III-Studie, ECHO 304, begonnen. Diese verglich den Einsatz von Pembrolizumab in Kombination mit Epacadostat, Pembrolizumab als Monotherapie und das EXTREME-Schema bei Patienten mit rekurrentem oder metastasiertem HNSCC. Die Ansprechraten (objective response rate, ORR) waren hier in der Gruppe Pembrolizumab/Epacadostat mit 31,4% (16,9 bis 49,3%) im Vergleich zum EXTREME-Schema mit 34,3% (19,1 bis 52,2%) ähnlich. In der Gruppe mit Pembrolizumab als Monotherapie war die Ansprechrate mit 21,1% (6,1 bis 45,6%) deutlich schlechter. Schwerwiegende Nebenwirkungen (u.a. Colitis, Nausea, Ödeme, Hepatitis, Pneumonitis, Osteomyelitis, akutes Nierenversagen) traten in den Gruppen Pembrolizumab/Epacadostat und EXTREME-Schema gleich häufig auf (in beiden Gruppen bei 35,3% der Patienten). Jedoch wurde in der Gruppe Pembrolizumab/Epacadostat die Therapie aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen (8,8% der Patienten) im Vergleich zur Gruppe mit EXTREME-Schema (20,6% der Patienten) deutlich seltener abgebrochen. Eine finale Auswertung der Studienergebnisse liegt noch nicht vor (ClinicalTrials.gov, 2022).

### 3.2.4 Kynurenin/Tryptophan-Ratio (Kyn/Trp-Ratio)

Die Kynurenin/Tryptophan-Ratio (Kyn/Trp-Ratio) wird als Maß für die IDO1-Aktivität postuliert. Der Vorteil der Bestimmung der IDO1-Aktivität im Serum anstelle der intrazellulären IDO1-Expression ist die deutlich leichtere methodische Durchführbarkeit und damit geringere Fehleranfälligkeit.

Ein Anstieg der Kyn/Trp-Ratio wurde bereits in mehreren Malignomen beschrieben (Ovarial- (Sperner-Unterweger et al., 2011), Zervix- (Hascitha et al., 2016), Lungen- (Suzuki et al., 2010; Engin et al., 2010) und kolorektales Karzinom (Huang et al., 2002) sowie malignes Melanom (Weinlich et al., 2007) und T-Zell-Leukämie (Masaki et al., 2015)).

Neben der Ratio wurde auch den einzelnen Stoffwechselprodukten eine prognostische Bedeutung zugesprochen. Eine geringere Trp-Konzentration sei mit einem schlechteren Überleben beim malignen Melanom (Weinlich et al., 2007) sowie Lungen- (Suzuki et al., 2010) und kolorektalen Karzinom (Huang et al., 2002) verbunden. Hingegen verschlechtere eine hohe Kyn-Konzentration die Prognose von Patienten mit adulter T-Zell-Leukämie (Masaki et al., 2015).

Creelan BC et al. zeigten, dass sich die Kyn-Konzentration bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom durch eine Radiatio sowie Chemotherapie erhöht. Patienten mit einer höheren Kyn-Konzentration hatten zudem auch eine schlechtere Prognose (Creelan et al., 2013).

### **3.3 TREM2**

#### 3.3.1 Grundlagen

Bei dem triggering receptor expressed on myeloid cells type 2 (TREM2) handelt es sich um einen extrazellulären Rezeptor (Jay et al., 2017), welcher sich auf myeloiden Zelllinien wie dendritischen Zellen und Makrophagen befindet (Song et al., 2017) und mit DNAX activating protein of 12 kDa (DAP12) als Adaptermolekül interagiert (Lue et al., 2015).

TREM2 wird mit einer Vielzahl von Funktionen assoziiert: Hierzu zählen Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Aktivierung und Beeinflussung der Phagozytose (Colonna und Wang, 2016; Mazaheri et al., 2017). Die Inflammation wird durch TREM2, u.a. durch eine negative Regulierung des toll-like receptor (TLR)-Pathways, ebenfalls beeinflusst (Ito et Hamerman, 2012). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten noch keine eindeutigen endogenen Liganden identifiziert werden, es liegen jedoch Hinweise auf anionische und lipidartige Liganden vor (Bailey et al., 2015; Daws et al., 2003).

Die Transkriptionsfaktoren, welche die TREM2-Expression regulieren, sind bisher noch nicht identifiziert. Die TREM2-Expression wird jedoch durch das Zytokin Interleukin (IL)-4 induziert (Turnbull et al., 2006).

TREM2 wurde erstmals im Jahr 2002 bei einem genetischen Screening von Patienten mit der Nasu-Hakola-Krankheit (auch als „Polyzystische lipomembranöse Osteodysplasie mit

sklerosierender Leukoenzephalopathie“ (PLOSL) bezeichnet) beschrieben. Patienten mit dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit, die sich mit ossären Zysten und einer progressiven Enzephalopathie mit schwerer Neurodegeneration (und in der Folge Tremor, Gangunsicherheiten, Demenz und Lähmungen) manifestiert, weisen eine loss of function-Mutation im TREM2-Gen auf (Paloneva et al., 2002). Die gleichen Krankheitssymptome entwickeln Patienten mit einer Mutation im DAP12-Gen (Xing et al., 2015). Dies zeigt die funktionelle Zusammenwirkung von TREM2 und DAP12.

Die klinischen Symptome der Nasu-Hakola-Krankheit lassen sich mit Defekten der Phagozytosefunktion in den myeloiden Zellen des Knochens (Osteoklasten) und des Gehirns (Microglia) erklären, wodurch die Knochenresorption (Bianchin et al., 2004) sowie die Phagozytose apoptotischer Neuronen gestört sind (Takahashi et al., 2005). Dies ist vermutlich ebenfalls die Ursache für die Assoziation einer Punktmutation im TREM2-Gen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des Morbus Alzheimer (Guerreiro et al., 2013).

### 3.3.2 Bedeutung in der Tumorummunologie und bisherige Therapieansätze

In der Mikroglia fördert TREM2 die Phagozytose von apoptotischen Neuronen und hemmt mittels des DAP12-Signalwegs die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen (Takahashi et al., 2005). Bei Übertragung auf das TME lässt sich schlussfolgern, dass TREM2 eine immunsuppressive Wirkung auf das TME hat.

Die bisher publizierten Ergebnisse zur Bedeutung der TREM2-Expression in Malignomen sind sehr heterogen und zum Teil widersprüchlich.

Cheng et al. beschrieben im Rahmen ihrer Pan-Cancer-Analyse, dass eine erhöhte TREM2-Expression des Platten- und Adenokarzinoms der Zervix, des diffusen B-Zell-Lymphoms, des pulmonalen Adenokarzinoms, des kutanen Melanoms sowie der thyreoidalen Karzinome mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben einhergehen. Im Gegensatz dazu beobachteten sie, dass Patienten mit einem niedriggradigen Gliom, einem hepatozellulären Karzinom sowie einem klarzelligem Nierenzellkarzinom bei einer erhöhten TREM2-Expression ein signifikant verringertes Gesamtüberleben aufweisen. Das krankheitsspezifische Überleben war in der Patientenkohorte von Cheng et al. bei einer TREM2-Überexpression in Platten- und

Adenokarzinomen der Zervix, thyreoidalen Karzinomen sowie niedriggradigen Gliomen signifikant schlechter (Cheng et al., 2021).

Studien zur Bedeutung von TREM2 beim OSCC liegen zurzeit noch nicht vor.

Cheng et al. konnten in ihrer Pan-Cancer-Analyse jedoch beobachten, dass die TREM2-Expression im HNSCC im Vergleich zum Normalgewebe erhöht ist (Chang et al., 2021).

Trotz der bisher nur wenigen Forschungsergebnisse wird TREM2 eine wesentliche Rolle bei der ICI-Resistenz von Tumoren zugewiesen.

Binnewies et al. beschrieben im Jahr 2021 TREM2 als Grund für eine gescheiterte Anti-PD-1-Therapie. In der Folge untersuchten sie die Effektivität eines Anti-PD-1-Antikörpers in Kombination mit einem Anti-TREM2-Antikörper im Mausmodell und konnten wie Molgora et al. bei Kombination dieser ein verbessertes Ansprechen beobachten. Sie stellten die Hypothese auf, dass Anti-TREM2-Antikörper bei Kombination mit einem Anti-PD1-Antikörper das Therapieansprechen durch eine geförderte T-Zell-Infiltration bzw. -Aktivierung sowie die Veränderung der Zusammensetzung der Tumor-assoziierten Makrophagen (tumor-associated macrophages, TAMs) verbessern. Zudem beobachteten sie eine höhere Anzahl von zytotoxischen T-Lymphozyten im TME, welche eine größere Menge von Zytokinen produzierten (Binnewies et al., 2021; Molgora et al., 2020).

Auch Xiong et al. beschrieben, dass ICI-resistente Tumoren eine TREM2-überexprimierende Makrophagensubpopulation aufweisen (Xiong et al., 2020).

### 3.3.3 Soluble TREM2 (sTREM2)

Soluble TREM2 (sTREM2) wurde als lösliche Ektodomäne des TREM2-Rezeptors erstmals 2008 nachgewiesen (Piccio et al., 2008). sTREM2 kann durch ein Shedding der Ektodomäne des Rezeptors (Kleinberger et al., 2014) oder über ein alternatives Splicing generiert werden (Jin et al., 2014).

Die Bedeutung von sTREM2 ist bei neurologischen Erkrankungen bisher deutlich besser erforscht als bei Malignomen. sTREM wird im Liquor cerebrospinalis eine Rolle als Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen zugeschrieben (Suárez-Calvet et al., 2016).

Es wurde eine höhere sTREM2-Konzentration in Liquorproben von Morbus Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne kognitive Einschränkung beschrieben (Shen et al., 2019; Zhong et al., 2017). Hierbei scheinen die sTREM2-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis in der frühen symptomatischen Phase des Morbus Alzheimer am höchsten zu sein und dann wieder abzunehmen, wenn die Krankheit fortschreitet (Ma et al., 2020; Suárez-Calvet et al., 2016). Zudem beobachteten Ma et al., dass eine erhöhte sTREM2 Konzentration mit einer erhöhten Tau-Konzentration einhergeht, wohingegen eine niedrige sTREM2-Konzentration mit einer niedrigen A $\beta$ -Konzentration einherging (Ma et al., 2020). Kleinberger et al. beobachteten zudem eine erhöhte sTREM2-Liquorkonzentration bei Multiple Sklerose-Patienten (Kleinberger et al., 2014).

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Antikörper TREM2 in der Membran stabilisieren kann und dieser somit vor dem Shedding zu sTREM2 geschützt wird. Ferner konnte hierdurch die Aktivität des Rezeptors erhöht werden (Schlepckow et al., 2020; Szykowska et al., 2021). Der aktuelle Stand der Forschung ist somit, dass die sTREM2-Konzentration die Aktivität von TREM2 und somit die Interaktionen mit seinen Liganden widerspiegelt.

Generell wurde sTREM2 bereits zugeschrieben, dass es die Apoptose von Makrophagen verhindern und das Zellüberleben (Wu et al., 2015), die Zellproliferation und Zellmigration fördern würde (Zhong et Chen, 2019).

Bei Übertragung auf maligne Erkrankungen lässt sich schlussfolgern, dass sTREM2 eine immunsuppressive Wirkung haben könnte.

Hinsichtlich der Bedeutung von sTREM2 bei Malignomen wurden bisher ausschließlich die Blutproben von Patienten mit High-Grade-Gliomen sowie nicht-glialer Hirntumoren untersucht. Die sTREM2-Konzentration war hierbei sowohl im Serum der Patienten mit High-Grade-Gliomen als auch bei den Patienten mit non-glialen Tumoren signifikant erniedrigt (Efendioğlu et al., 2021).

### **3.4 Tumormikroumgebung**

Ein kompetentes Immunsystem besitzt die Fähigkeit, neoplastisch transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Ein Meilenstein in der Erforschung des TMEs war die

Beobachtung, dass immunsuppressive Patienten ein höheres Risiko haben, Tumore (v.a. virusassoziierte) zu entwickeln (Grulich et al., 2007).

Die anti-tumorale Aktivität wird im Wesentlichen über das zelluläre Immunsystem, insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten, realisiert. Die zytotoxischen T-Lymphozyten erkennen spezifische, über major histocompatibility complex (MHC)-I-Moleküle an der Oberfläche von Tumorzellen präsentierte Antigene als fremd und können in einem folgenden Schritt die Apoptose initiieren (Marincola et al., 2000).

Weitere wichtige zelluläre Komponenten der immunologischen Tumorabwehr sind T-Helferzellen, welche u.a. die zytotoxischen T-Lymphozyten aktivieren, Teil des immunologischen Gedächtnisses und für die Freisetzung zytotoxischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  von Bedeutung sind. Des Weiteren zählen NK-Zellen, die in der Lage sind, Tumorzellen auch ohne vorausgehende Sensibilisierung zu zerstören, und Makrophagen dazu (Markman et Shiao, 2015).

### **3.5 Makrophagen**

#### **3.5.1 Makrophagenpolarisation**

Als Makrophagenpolarisation wird der Prozess bezeichnet, bei welchem Makrophagen im Rahmen einer Reaktion auf gewebespezifische Reize einen spezifischen Phänotyp annehmen.

Es werden verschiedene phänotypische Subpopulationen von Makrophagen basierend auf der Expression ihrer Zelloberflächenmarker, der Produktion spezifischer Faktoren und ihren biologischen Aktivitäten beschrieben. Die zwei Hauptgruppen stellen die klassisch aktivierten (pro-inflammatorischen) M1-Makrophagen sowie die alternativ aktivierten (anti-inflammatorischen) M2-Makrophagen dar. Zunächst wurden feste und definierte Pathways für die Polarisation der Makrophagen beschrieben (Mobley et al., 2007; Zhao et al., 2009). Spätere Ergebnisse zeigten jedoch einen hohen Grad an Plastizität innerhalb dieser Abläufe (Martinez et Gordon, 2014).

M1-Makrophagen werden typischerweise durch Zytokine, die von T-Helferzellen des Typs 1 sezerniert werden, hierunter IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , oder durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) induziert. Die M1-Makrophagen produzieren und sezernieren höhere Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen und nur geringe Mengen an anti-inflammatorischen

Zytokinen (Peltanova et al., 2019). Außerdem setzen M1-Makrophagen Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) frei. M1-Makrophagen sind hierdurch in der Lage, virale und bakterielle Infektionen abzuwehren, Pathogene zu phagozytieren sowie entartete Zellen zu zerstören. Durch die Freisetzung von ROS beeinträchtigen M1-Makrophagen zudem die Geweberegeneration und Wundheilung (Martinez et Gordon, 2014).

Die Polarisierung zu M2-Makrophagen wird durch Zytokine, welche von T-Helferzellen des Typs 2 sezerniert werden, gefördert (Porta et al., 2015). M2-Makrophagen weisen somit ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil auf. Funktionell besitzen M2-Makrophagen die potentere Phagozytosekapazität gegenüber apoptotischen Zellen, sie fördern die Gewebereparatur und Wundheilung und besitzen zudem pro-angiogene und pro-fibrotische Eigenschaften (Braga et al., 2015; Jetten et al., 2014; Kurowska-Stolarska et al., 2009). Daher nehmen M2-Zellen im Allgemeinen an Reaktionen der T-Helferzellen des Typs 2 und der Parasitenclearance teil (Beschinn et al., 2013; Chua et al., 2013; Murray et al., 2011; Tundup et al., 2012), wirken anti-inflammatorisch und koordinieren das Gewebsremodelling (Hinz et al., 2012; Mantovani et al., 2013), die Angiogenese, Immunregulation und das Tumorstadium (Belgiovine et al., 2016; Porta et al., 2015; Qian et al., 2010; Ruffell et al., 2012).

Die Einteilung der Makrophagen in einen M1- und M2-Phänotyp weist keine klare Grenze auf. In Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Signalen kann eine Umpolarisierung der Makrophagen erfolgen. (Martinez et Gordon, 2014).

### 3.5.2 Makrophagenmarker

Die Makrophagen lassen sich anhand der Expression unterschiedlicher cluster of differentiation (CD)-Moleküle unterscheiden.

Die Gesamtheit der Makrophagenpopulation exprimiert CD68 (van der Kooij et al., 1997). Als M1-Makrophagen-Marker kann CD11c verwendet werden (Ingalls et Golenbock, 1995; Postigo et al., 1991). Als spezifischer M2-Marker ist CD163 am gebräuchlichsten (Fabriek et al., 2005), aber auch CD206 hat in der näheren Vergangenheit an Bedeutung gewonnen (Ezekowitz et Gordon, 1984; Jaynes et al., 2020).

### 3.5.3 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Tumorzellen sind in das TME eingebettet, welches auf die malignen Zellen Einfluss nehmen und deren Verhalten steuern kann (Gould et Courtneidge, 2014; Polyak et al., 2009; Polyak et al., 2010). Gleichzeitig nehmen auch die malignen Zellen Einfluss auf das sie umgebende Milieu (Karthaus et al., 2012). Diese bidirektionale Kommunikation ist für die Tumorprogression sowie die anti-tumorale Aktivität von hoher Bedeutung (Quail et Joyce, 2013).

TAMs sind die Zellen mit der höchsten Abundanz im TME und ihnen wird eine wachstumsfördernde Wirkung auf den Tumor, die Verstärkung der tumoralen Neoangiogenese sowie die Unterdrückung der anti-tumoralen Aktivität zugesprochen (Allavena et al., 2012; Chittezhath et al., 2014; Hao et al., 2012; Solinas et al., 2009).

Bei vielen Malignomen wie dem Ovarial-, Mamma-, und Pankreaskarzinom sowie dem folliculären B-Zell-Lymphom, Weichteilsarkom und klassischen Hodgkin-Lymphom konnte eine positive Korrelation der Makrophageninfiltration mit einem größeren Tumordurchmesser, positivem Nodalstatus, einer schlechteren Prognose, einem gehäuften Auftreten von Rezidiven und einer niedrigen Überlebenschance beobachtet werden (Kurahara et al., 2011; Ruffell et al., 2012; Squadrito et al., 2011).

Mittlerweise ist jedoch bekannt, dass nicht die Gesamtzahl der TAMs, sondern deren Polarisation (im Sinne des Verhältnisses von M1- zu M2-polarisierten Makrophagen) und damit deren Zytokinprofil sowie deren Wechselwirkungen mit Tumorzellen für die Prognose von Bedeutung ist (Jayasingam et al., 2020).

Die Polarisation der Makrophagen wird im Tumor durch u.a. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , IL-10 und Hitzeschockproteine moduliert, sodass TAMs vermehrt eine anti-inflammatorische M2-Polarisierung aufweisen (Biswas et al., 2012; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

In mehreren Malignomen wurde die Bedeutung des Verhältnisses von M1- zu M2-Makrophagen bereits untersucht: Im Ovarialkarzinom nimmt dieses mit steigendem Grading ab. Zhang et al. beschrieben das M1-/M2-Makrophagen-Verhältnis als wichtigsten prognostischen Faktor für das Ovarialkarzinom (Zhang et al., 2014). Auch bei Gliomen, Melanomen, Prostata- (Zhang et al., 2014) und Magenkarzinomen (Pantano et

al., 2013) korreliert ein reduziertes M1-/M2-Makrophagen-Verhältnis mit einem geringeren Überleben.

Weber et al. zeigten für das OSCC einen Zusammenhang zwischen nodalpositiven Karzinomen und einem erhöhten Verhältnis von M2-Makrophagen zur Gesamtmakrophagenpopulation (Weber et al., 2014).

Sowohl das Auftreten IDO1<sup>+</sup>- (Herrera-Rios et al., 2020; Choe et al., 2014) als auch TREM2<sup>+</sup>-Makrophagen (Molgora et al., 2020; Wu et al., 2015) wurde bereits in Tumoren beschrieben. Ihr Einfluss in der Regulation der lokalen und systemischen, tumorinitiierten Immunsuppression ist jedoch noch unklar.

Ein genaueres Verständnis der Makrophagenpolarisation in Tumoren könnte wesentlich zur Entwicklung neuer immunonkologischer Therapieansätze beitragen.

Das Reduzieren der TAMs bzw. die Modulation der TAM-Funktionen könnte eine hoffnungsvolle Strategie darstellen, um ICI-resistente Patienten in ICI-sensitive Patienten umzuwandeln. Bisher konnte durch den gezielten Angriff der TAMs nur eine geringe Prognoseverbesserung der Patienten verzeichnet werden (Butowski et al., 2016; Calvo et al., 2017; Jahchan et al., 2019; Nywening et al., 2016). Dies wurde u.a. auf die geringe Tumorspezifität zurückgeführt (Jahchan et al., 2019). Eine genauere Spezifizierung der TAMs und somit eine gezieltere Ansteuerung dieser könnte eine effektive Therapiestrategie darstellen.

### **3.5 Biomarker**

Trotz zahlreicher Studien zur molekularen Charakterisierung des OSCCs in den letzten Jahrzehnten ist es beim OSCC bisher nicht gelungen, serologisch nachweisbare Biomarker zu detektieren, um diese in der klinischen Diagnostik und dem Therapiemonitoring zu etablieren.

Im Allgemeinen stehen für das OSCC zurzeit die folgenden, bei anderen Malignomen bereits in der klinischen Diagnostik etablierten, Biomarker squamous cell carcinoma antigen (SCCA), Carcinoembryonales Antigen (CEA) und cytokeratin 19 fragment (Cyfra 21-1) zur Verfügung (De Paz et al., 2019). Diese Tumormarker weisen jedoch für das

OSCC nur eine unzureichende Spezifität (d.h. bei Gesunden und benignen Erkrankungen nicht nachweisbar) und Sensitivität (d.h. bei jedem OSCC-Patienten nachweisbar) auf, sodass sie in der klinischen Routine keine Anwendung finden.

Das SCCA besteht aus den zwei Isoformen SCCA1 und SCCA2, die der SERPIN-Familie angehören. In Plattenepithelien von Gaumen, Tonsille, Ösophagus, Lunge und Uterus wird eine normale Expression dieses Proteins gefunden, wohingegen in Karzinomen dieser Organe eine Überexpression beobachtet werden kann (Wu et al., 2020). Die Serumlevel von SCCA bei HNSCC-Patienten zeigten keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben oder der TNM-Klassifikation (Imai et al., 2015; Travassos et al., 2018).

Das Glykoprotein CEA gehört zur Familie der Immunglobuline und hat als Tumormarker v.a. Bedeutung beim fortgeschrittenen Kolonkarzinom. Für das HNSCC weist es eine geringere Sensitivität in der Primärdiagnostik auf als SCCA (Kurokawa et al., 1997).

Der klinische Nutzen von Cyfra 21-1 in der Diagnostik des HNSCCs ist begrenzt. Rudhart et al. beschrieben jedoch eine signifikante Konzentration mit dem Nodalstatus sowie dem Gesamtüberleben. Sie beobachteten zudem, dass die Konzentration von Cyfra 21-1 bei Auftreten eines Rezidivs anstieg, dies jedoch nur mit einer Sensitivität von 32% und einer Spezifität von 78% für ein Tumorrezidiv (Rudhart et al., 2020).

Die Identifikation eines, im besten Fall serologisch nachweisbaren, Biomarkers könnte dabei helfen, Risikopatienten im Sinne der Primärprävention zu screenen, den individuellen Krankheitsverlauf eines Patienten vorherzusagen (Prognoseabschätzung, prognostischer Biomarker), die optimale Therapiestrategie auszuwählen und den Therapieverlauf zu kontrollieren (prädiktiver Biomarker), um ggf. auch vor der Manifestation klinischer Symptome frühzeitig therapeutisch intervenieren zu können.

### **3.6 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die Expression von IDO1 und TREM2 in Primärtumoren sowie Lymphknotenmetastasen des OSCCs zu bestimmen und eine

Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern sowie eine potentielle prognostische Relevanz zu identifizieren.

Im nächsten Schritt wurden die Makrophagenpopulationen in peripheren mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) und Gewebeproben untersucht. Insbesondere die Anteile IDO1- und TREM2-exprimierender Makrophagenpopulationen wurden hier zwischen Tumor- und gesunden Patienten sowie zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe verglichen.

sTREM2 (das Shedding- bzw. alternative Splicingprodukt von TREM2) und die IDO1-Aktivität (gemessen als Kyn/Trp-Ratio) wurden als serologisch bestimmbare Biomarker untersucht.

Im nächsten Schritt wurde die Kyn/Trp-Ratio auf eine Korrelation mit der IDO1-Expression in epithelialen Tumorzellen und PBMCs untersucht.

Final erfolgte die Evaluation der IDO1-Expression sowie der IDO1-Aktivität als inflammatorische Marker im postoperativen Verlauf.

Es wurden folgende Schlüsselfragen formuliert:

- Korrelieren die immunhistochemisch ermittelten Expressionen von IDO1 und TREM2 mit klinischen und histopathologischen Parametern?
- Besteht eine prognostische Relevanz der immunhistologisch nachgewiesenen Expressionen von IDO1 und TREM2 im Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit?
- Korrelieren die Expressionen von IDO1 und TREM2 in PBMCs, im Speziellen in Makrophagen, mit klinischen Parametern und sind damit als ergänzender diagnostischer Test für Tumorpatienten geeignet?
- Gibt es einen Unterschied hinsichtlich der Abundanz IDO1- und TREM2-exprimierender Makrophagenpopulationen zwischen Tumorgewebe und gesundem Nachbargewebe?
- Eignen sich die IDO1-Aktivität sowie sTREM2 als Biomarker des OSCCs?
- Korreliert die IDO1-Aktivität mit der IDO1-Expression in PBMCs oder in epithelialen Tumorzellen?
- Gibt es eine Veränderung der IDO1-Expression sowie der IDO1-Aktivität im postoperativen Verlauf?

## **4. Material und Methodik**

### **4.1 Ethikanträge**

Positive Vota der Ethikkommissionen der Universität Heidelberg (Nummer: S-360/2011) zum retrospektiven Teil sowie der Universität des Saarlandes (Nummer: 37/20) zum prospektiven Teil der vorliegenden Arbeit lagen vor. Eine mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten ist erfolgt.

### **4.2 Immunhistochemische Färbung**

#### **4.2.1 Tissue microarrays (TMAs)**

Die immunhistochemischen Färbungen wurde auf sogenannten tissue microarrays (TMAs) durchgeführt. Diese ermöglichen eine simultane Fixierung und Färbung von mehreren Gewebeproben, wodurch zum einen die Reliabilität der Methodik gesteigert und zum anderen die Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Färbung vereinfacht wird.

Die Gewebeproben der TMAs wurden in dem Zeitraum von 2010 bis 2016 in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg gesammelt und die TMAs nach bereits veröffentlichten Protokollen angefertigt (Freier et al., 2003; Moratin et al., 2019).

#### **4.2.2 Durchführung der Immunhistochemie**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der indirekten Immunhistochemie angewandt. Die hierfür verwendeten Materialien sind im Anhang tabellarisch aufgeführt. Bei dem Verfahren der indirekten Immunhistochemie ist der jeweilige Primärantikörper unmarkiert und erst der gegen den primären Antikörper gerichtete Zweitantikörper (Detektionsantikörper) ist an ein Enzym gebunden, welches farblose Chromogene in unlösliche, gefärbte Endprodukte umwandelt. Um die Spezifität der Primär- und Sekundärantikörper zu überprüfen, wurden bei der Etablierung der Protokolle Positiv- und

Negativkontrollen an gesundem Mundschleimhautgewebe durchgeführt. Bei den darauffolgenden Färbungen der TMAs sind ebenfalls Negativkontrollen erfolgt.

Um das Gewebe und die Gewebeantigene der TMAs freizulegen, wurde zunächst eine Entparaffinierung mithilfe von Xylol durchgeführt (dreimal Xylol, für jeweils 5 min) und anschließend das Gewebe der TMAs mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (zweimal >99,8%iges Ethanol, einmal 96%iges Ethanol, einmal 70%iges Ethanol, für jeweils 3 min) und mit destilliertem Wasser für eine min rehydratisiert.

Im nächsten Schritt wurde das Gewebe hitzeinduziert demaskiert (heat induced epitope retrieval, HIER). Hierfür wurden die TMAs für 30 min in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfgerar auf 100°C erhitzt und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Durch dieses Vorgehen verspricht man sich, dass Quervernetzungen der Epitope, welche durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung entstanden sind und die Antigenität stören, wieder rückgängig gemacht werden.

Das darauffolgende Umranden der Gewebeproben der TMAs mit einem Fettstift verhinderte das Verlaufen der danach aufgetragenen Antikörper- und Substratlösungen. Die TMAs wurden zweimal für 5 min in 1x PBS unter maschinellm Schwenken gewaschen.

Das untersuchte Gewebe enthält Zellarten mit zelleigenen Peroxidasen (z.B. Leukozyten der myeloischen Zellreihe). Deswegen ist im darauffolgenden Schritt eine Inaktivierung dieser endogenen Peroxidasen erfolgt, da diese sonst später ebenfalls wie das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym die farblosen Chromogene umwandeln und somit zu unspezifischen Färbungen führen würde. Die Inaktivierung der endogenen Peroxidasen erfolgte durch das Benetzen der TMAs mit BLOXALL Endogenous Enzyme Blocking Solution.

Die TMAs wurden anschließend für 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert.

Daraufhin wurden die TMAs zweimal für jeweils 5 min mit destilliertem Wasser sowie einmal für 5 min mit TBST gewaschen.

Um unspezifische Bindungen an demaskierte Antigenbindungsstellen und somit Kreuzreaktionen zu verhindern, wurde 2,5%iges Pferdeserum aufgetragen und die TMAs anschließend für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert.

Darauffolgend wurde das Pferdeserum vorsichtig entfernt und je Objektträger 500 µL der entsprechenden Lösung des verdünnten Antikörpers auf die TMAs aufgetragen (IDO1: 1:400; TREM2: 1:100).

Auf den Objektträger, der als Negativkontrolle diente, wurde PBS aufgetragen. Durch die Negativkontrolle können bei der späteren Auswertung unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers am Gewebe ausgeschlossen werden.

Die TMAs sowie die Negativkontrolle wurden anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die überschüssigen Antikörperlösungen vorsichtig entfernt und die TMAs dreimal unter maschinellm Schwenken für jeweils 5 min in TBST gewaschen. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper ImmPRESS Universal Antibody (anti-mouse IgG/anti-rabbit IgG, Peroxidase) aufgetragen und die TMAs für 30 min in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Es folgten drei Waschschrirte in destilliertem Wasser unter maschinellm Schwenken für jeweils 5 min.

Anschließend wurden äquivalente Volumina von Reagenz 1 und 2 des ImmPACT DAB EqV Substrate vermengt und diese Mischung auf die TMAs aufgetragen. Durch die Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entstand ein braunes Präzipitat. Die Mischung wurde anschließend nach 1 min beim Färbeprotokoll von IDO1 und nach 2 min bei TREM2 von den TMAs entfernt und die TMAs zweimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen.

Um eine stärkere Kontrastbildung der zuvor gefärbten Areale zu erreichen, erfolgte eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin. Das Hämatoxylin wurde anschließend unter laufendem Wasser für 20 min ausgewaschen.

#### 4.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von IDO1 wurde für die Färbung der Epithelzellen in Anlehnung an den immunreaktiven Score (IRS) durchgeführt. Der IRS wurde ursprünglich zur Bewertung der Expression von Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom entwickelt (Remmele et Stegner, 1987). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Berechnung aus dem Produkt von Färbeintensität und prozentualem Anteil IDO1<sup>+</sup>-Zellen. Hierbei wurden die Intensität (1 = keine, 2 = schwach, 3 = mittel und 4 = stark) und der Anteil IDO1<sup>+</sup>-Zellen (1 = keine positiven Zellen, 2 = <33% positive Zellen, 3 = 33-66 % positive Zellen und 4 = ≥67% positive Zellen) in vier Stufen eingeteilt.

Der Gesamtpunktwert lag somit auf einer Skala von eins bis 16 Punkten, wobei ein Wert ≥ 8 Punkte als positive Reaktion gewertet wurde. Bei der Auswertung der

immunhistochemischen Färbungen wurde zudem die Lokalisation der Färbung (nucleär, nucleär und zytoplasmatisch oder nur zytoplasmatisch) beurteilt.

Zudem wurden die Immunzellen hinsichtlich ihrer Abundanz und IDO1-Expression (keine, IDO1-negativ, IDO1-positiv) bewertet.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von TREM2 wurde ebenfalls die Lokalisation der Immunzellen (1 = intratumoral/-metastatisch, 2 = peritumoral/-metastatisch und 3 = intra- und peritumoral(-metastatisch)) sowie deren Abundanz bewertet (1 = 1-3, 2 = 4-14 und 3  $\geq$  15).

Die Scores zu den immunhistochemischen Färbungen sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt.

**Tabelle 7: Scoring der immunhistochemischen Färbung von IDO1**

Kategorie	1	2	3	4
<b>A (Anzahl der Epithelzellen)</b>	Keine Färbung	< 33%	34-66%	> 67%
<b>B (Intensität der Färbung)</b>	Keine Färbung	Schwach	Mittel	Stark
<b>C (Lokalisation in der Epithelzelle)</b>	Nucleär	Nucleär und zytoplasmatisch	Zytoplasmatisch	
<b>D (Immunzellen)</b>	Keine	IDO1-negativ	IDO1-positiv	

**Tabelle 8: Scoring der immunhistochemischen Färbung von TREM2**

Kategorie	1	2	3
<b>A (Verteilung der Immunzellen)</b>	Intratumeral (-metastatisch)	Peritumeral (-metastatisch)	Intra- und Peritumeral (-metastatisch)
<b>B (Anzahl der Immunzellen)</b>	1-3	4-14	$\geq$ 15

## 4.3 Probenakquirierung für FACS und ELISA

### 4.3.1 Rekrutierung der Tumor- und Kontrollpatienten

Die Blutproben sowie Gewebeproben für den prospektiven Teil dieser Arbeit wurden in dem Zeitraum von 2020 bis 2022 von Patienten, die in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden, gesammelt.

Die Tumorpatienten wurden nach der zu dem jeweiligen Zeitpunkt geltenden nationalen Leitlinie behandelt. Bei allen Patienten ist eine primäre chirurgische Resektion des Tumors mit Neck Dissection erfolgt.

Eingeschlossen wurden Patienten mit einem in sano resezierten, histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle unabhängig vom Alter, dem Geschlecht oder der cTNM-Klassifikation. Um ein homologes Kollektiv zu gewährleisten, wurden Patienten mit einem Rezidiv, einer neoadjuvanten Therapie und anderen Tumorentitäten der Mundhöhle ausgeschlossen.

Die postoperative histopathologische Klassifikation der Tumoren erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Begutachtung des Resektats durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Grundlage der Begutachtung war die 8. TNM-Klassifikation.

Die Blutproben der gesunden Kontrollprobanden wurden ebenfalls von Patienten der Klinik für

Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes gesammelt, die sich dort aufgrund einer anderen, nichtmalignen Erkrankung einem operativen Eingriff unterzogen haben.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die an einer Demenz, Depressionen, Diabetes mellitus oder einer Autoimmunerkrankung sind, da diese nachweislich einen Einfluss auf die IDO1- und TREM2-Expression haben können.

Sowohl in der Gruppe der Malignompatienten als auch in der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden wurden Patienten ausgeschlossen, die zuvor an einem anderen Malignom erkrankt waren.

#### 4.3.2 Entnahme von Blutproben

Die Entnahme von Blutproben erfolgte mittels steriler Punktion einer peripheren Vene im Rahmen einer Routineblutentnahme oder intraoperativ aus einem femoralen Zentralvenenkatheter. Die Abnahme erfolgte in jeweils zwei EDTA-S-Monovetten und eine Serum-S-Monovette.

#### 4.3.3 Ficoll-Isolierung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

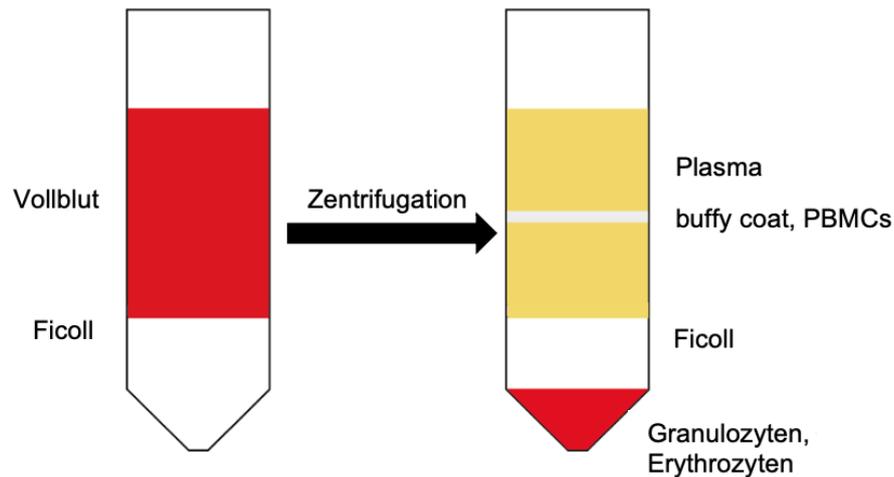
PBMCs sind eine Mischpopulation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Sie beinhalten wichtige Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen) und Monozyten.

Die Isolierung der PBMCs wurde steril an einer Sterilbank durchgeführt. Diese wurde vor und nach dem Arbeiten mit 70% Isopropanol gereinigt. Die verwendeten Materialien sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Das Vollblut wurde zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Auf 20 ml der Mischung wurden anschließend vorsichtig 15 ml Ficoll-Paque pipettiert, sodass die Blutphase auf der Ficoll-Phase stand und es zu keiner Vermischung der Phasen kam. Die Dichte des Ficolls (1,077 g/ml) erlaubte bei der Dichtegradienten-Zentrifugation (1800 g, 30 min, ohne Bremse) eine Separation der Zellpopulationen des Vollbluts gemäß ihrer Dichteunterschiede. Ficoll besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten sowie eine geringere Dichte als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Dementsprechend setzte sich nach der Zentrifugation die oberste Schicht aus Blutplasma und Thrombozyten zusammen, wohingegen sich zwischen der obersten Schicht und dem Ficoll eine weiße Grenzschicht aus Lymphozyten und Monozyten (buffy coat) befand. Unter dem Ficoll befanden sich die Erythrozyten und die restlichen Granulozyten. Die zuvor beschriebene Schichtung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der buffy coat wurde anschließend abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt. Um die PBMCs weitestmöglich von Ficoll und Thrombozyten zu befreien, wurden sie im

Anschluss zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen zwischen den Waschsritten jeweils 5 min bei 1500 g zentrifugiert.



**Abbildung 1:** Ablauf der Ficoll-Isolierung der peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Eigene Darstellung).

#### 4.3.4 Verarbeitung des Serums

Die Serum-S-Monovetten wurden 10 min aufrecht stehen gelassen und anschließend für 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in Mengen von 150 µl pro Tube eingefroren.

#### 4.3.5 Dissoziation von Gewebeproben

Von den Tumoren sowie von gesundem Nachbargewebe wurden intraoperativ Teile entnommen, welche anschließend in MACS Tissue Storage Solution gekühlt schnellstmöglich zum Labor transportiert wurden. Dort wurde das Gewebe zunächst gewogen und mittels Skalpell in einer Petrischale zerkleinert. Hierbei wurden auch fibröse und nekrotische Anteile, soweit möglich, entfernt. Anschließend wurden Stückchen von einer Größe von 2 bis 4 mm in die GentleMACS C-Tubes überführt. In die Tubes wurde eine Enzymlösung bestehend aus den Enzymen A, H und R des Tumour Dissociation Kit human hinzugegeben. Bei einem Gewicht von unter 0,2 g wurden 2,2 mL RPMI mit 12,5 µl Enzym A, 100 µl Enzym H und 10 µl Enzym R vermischt. Bei einem Gewicht von bis zu 1 g wurden 4,7 ml RPMI mit 25 µl Enzym A, 200 µl Enzym H und 20 µl Enzym R

vermengt. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Tubes anschließend auf den gentleMACS Dissociator aufgesteckt und das 37C\_h\_TDK\_3 Programm des MACS Dissociators gestartet. Die Zellsuspension wurde daraufhin durch einen Filter mit einer Porendichte von 70 µm filtriert, wobei hierbei 20 mL RPMI 1640 hinzugegeben wurden. Es folgte eine Zentrifugation für 7 min bei 1500 g. Das Zellpellet wurde anschließend kryokonserviert.

#### 4.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Für die Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität wurde der Luna-FL Dual Fluorescence Cell Counter verwendet. Hierfür wurden 18 µl der Zelllösung mit 2 µl Acridinorange/Propidiumiodid versetzt. Acridinorange kann die Zellmembran vitaler Zellen überwinden und bindet in der Zelle an Nukleinsäuren. Bei Bindung an double stranded DNA (dsDNA) fluoresziert es grün, bei Bindung an single stranded DNA (ssDNA) oder RNA fluoresziert es rot. Im Gegensatz dazu kann Propidiumiodid nicht die Zellmembran vitaler Zellen überwinden. Nur bei avitalen Zellen bzw. Zellen mit kompromittierter Zellmembran bindet es an die in diesen Zellen vorhandenen Nukleinsäuren und fluoresziert rot. Durch den Förster-Resonanz-Energietransfer absorbiert das Propidiumiodid-Signal das Acridinorange-Signal in avitalen Zellen, um doppelt positive Signale zu verhindern (Ligasová et Koberna, 2021).

#### 4.3.7 Kryokonservierung und Auftauen von PBMCs

Für die Zellkonservierung wurde das Zellpellet in eine Lösung aus 90% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in die Kryoröhrchen überführt. Bei DMSO handelt es sich um ein Gefrierschutzmittel, welches in die Zellen eindringt und dabei zu einer Verminderung des Wassergehaltes führt, wodurch die Bildung von Eiskristallen und damit eine Schädigung der Zellen verhindert wird. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte zügig durchgeführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einen Mr. Frosty Freezing Container (welcher zuvor mit 2-Propanol gefüllt wurde) transferiert und in diesem für 24 Stunden bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert. Durch das 2-Propanol ergab sich eine Kühlrate von -1°C pro

min. Nach 24 Stunden wurden die Proben in den stickstoffgefüllten Kryotank (-196°C) überführt und dort bis zur Verwendung gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad. War die Zellsuspension nahezu vollständig aufgetaut, wurde sie 1:1 in PBS resuspendiert und sofort abzentrifugiert (5 min bei 1500 g). Um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen, wurden der Überstand der Zellen abpipettiert und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen.

## **4.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

### 4.4.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie am fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine lasergestützte Methode zur quantitativen und funktionellen Analyse von Einzelzellen in einer Zellsuspension.

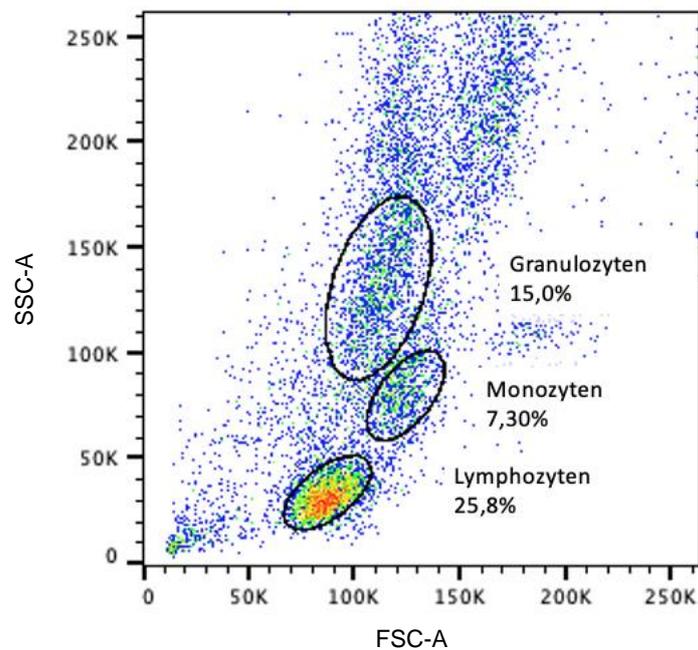
Die Messung beruht auf der Emission von optischen Signalen (Streulicht- und Fluoreszenzsignalen) seitens der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren.

Hierfür wird die Zellsuspension über einen Unterdruck aus dem Probenröhrchen in eine Kapillare gesogen, in der sie von einer isotonen Pufferlösung (Trägerlösung) umgeben ist. Durch die hohe Fließgeschwindigkeit dieser Lösung und den trichterförmigen Aufbau der Messzelle werden die Zellen noch vor dem ersten Messpunkt nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in einen laminaren Einzelstrom verwandelt. Die Zellen passieren daraufhin Laser unterschiedlicher Anregungswellenlängen. Wenn der Laserstrahl auf eine Zelle fällt, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut und von Detektoren registriert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert (Adan et al., 2017; Picot et al., 2012)

Die Streulichteigenschaften einer Zelle sind abhängig von ihrer Größe, strukturellen Membraneigenschaften und intrazellulären Bestandteilen (Díaz et al., 2010; Tracy et al., 2010).

Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter channel, FSC) entsteht axial zum Laserstrahl und erlaubt eine Aussage über die Zellgröße, wohingegen das durch ein Zählereignis in perpendikulärer Richtung zum Laserstrahl gestreute Licht, das Seitwärtslicht (sideward scatter channel, SSC), mit der Granularität von Zellen korreliert. Da jede Zelle ein

bestimmtes FSC/SSC-Verhältnis aufweist, ist hierdurch eine grobe Einteilung der Zellen nach morphologischen Kriterien möglich (Jahan-Tigh et al., 2012). Die PBMCs lassen sich wie folgt einteilen: Granulozyten sind mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$  relativ klein, besitzen aber eine hohe Granularität. Dagegen sind Monozyten mit bis zu 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser die größten Leukozyten. Lymphozyten liegen hinsichtlich der Größe zwischen Granulozyten und Monozyten und weisen von diesen die geringste Granularität auf (Sucić et al., 1989). Zählereignisse, die sehr hohe FSC- und SSC-Werte erreichen, gelten als Zellaggregate, während Zellfragmente im unteren Wertebereich erfasst werden. Zellaggregate wie auch Zellfragmente können somit von den folgenden Fluoreszenzanalysen ausgeschlossen werden. Die Zellpopulationen der PBMCs in Abhängigkeit von ihrer Zellgröße und Granularität sind in Abbildung 2 dargestellt.



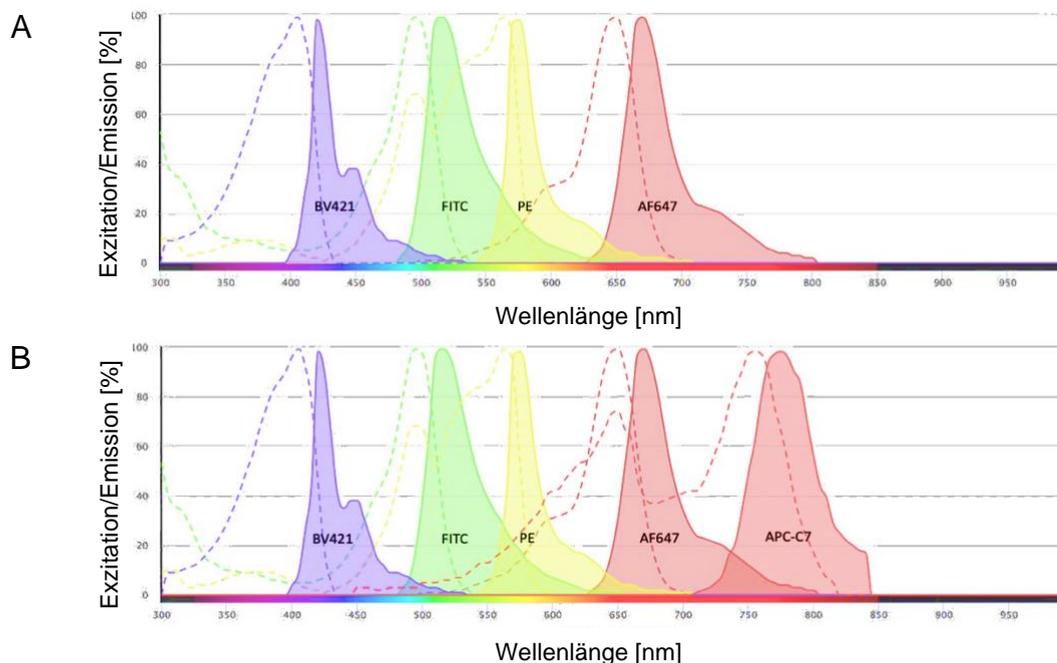
**Abbildung 2:** Zellpopulationen der peripheral blood mononuclear cells bei der durchflusszytometrischen Messung in Abhängigkeit von ihrer Zellgröße (FSC-A) und Granularität (SSC-A; Eigene Darstellung).

Abkürzungen: FSC-A = forward scatter area; SSC-A = side scatter area

Mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome), die an Antikörper, welche gegen das jeweils zu bestimmende Oberflächenantigen oder intrazelluläre Protein gerichtet sind, gekoppelt sind, werden die Zellen vor der Durchführung der Durchflusszytometrie markiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Alexa Fluor 647 (AF647), Allophycocyanin-cyanine dye indotricarbocyanine (APC-C7) und Brilliant Violette 421 (BV421) verwendet. Die Laser regen die jeweiligen antikörpergekoppelten Fluorochrome an. Wenn eine mit einem

Fluorochrom-gekoppelte Zelle mit dem für das Fluorochrom passenden Wellenlänge angeregt wird, wird diese auf ein höheres Energieniveau angehoben (Exzitation). Dieser Zustand kann nur für wenige Nanosekunden gehalten werden. Durch konformationelle Veränderungen innerhalb des Fluorochroms wird thermische Energie abgegeben, sodass die Elektronen kurzzeitig auf ein etwas niedrigeres, aber stabileres Energieniveau fallen. Anschließend gelangen die Elektronen zurück auf das Ausgangsenergieniveau. Die dabei freiwerdende Energie ist Fluoreszenz, d.h. emittiertes Licht, das eine größere Wellenlänge als der exzitierende Laser aufweist (Emission; Batard et al., 2002; Matko et Edidin, 1997). Diese Emissionen werden von einem Photodetektor erfasst.

Häufig können mehrere Fluorochrome über ein Licht der gleichen Wellenlänge angeregt werden. Durch das Zuschalten von Filtern ist es jedoch möglich, dass diese nur emittiertes Licht bestimmter Wellenlängen passieren lassen, während sie die übrigen Wellenlängen absorbieren (McKinnon, 2018). Hierdurch ist es möglich, mit dem in dieser Arbeit verwendeten FACS Verse, mit nur drei Lasern acht verschiedene Fluorochrome gleichzeitig in acht verschiedenen Kanälen zu messen. In der Abbilung 3 sind die Exzitations- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung der Exzitations- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome der Panel (A) IDO1 und (B) TREM2 (Eigene Darstellung).

Obwohl für die multiparametrischen FACS-Analyse Fluorochrome ausgewählt werden, die in ihren Emissionsspektren weitmöglichst differieren, kann es durch das partielle spektrale

Überlappen passieren, dass nicht nur das ausgesandte Licht eines Fluorochroms, sondern auch das eines anderen Fluorochroms gemessen wird. Es würde somit eine zusätzliche falsch-positive Emission gemessen werden. Um dies zu verhindern, führt man vor der eigentlichen Messung der Proben eine Kompensation durch. Diese wurde im Rahmen der Durchführung der Experimente dieser Dissertation zuvor sowohl mittels BD CompBeads sowie zur Verifikation der hiermit erhaltenen Ergebnisse mittels fluorescence minus one (FMO) manuell durchgeführt (Hulspas et al., 2009).

#### 4.4.2 Färbung, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Pro Kyroröhrchen lagen nach dem Auftauen und Auswaschen des DMSO  $10^6$  Zellen vor. Für die Färbung der Oberflächenantigene (TREM2, CD326) wurden die Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und mit den Antikörpern für 15 min inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die FACS-Röhrchen für 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet aufgeklopft.

Für die sich anschließende intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zunächst für 15 min in 100  $\mu$ l 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für die Permeabilisierung in Tween 20 (Verdünnung: IDO1 0,2%, TREM2: 0,5%) resuspendiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1500 g) pelletiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 100  $\mu$ l FACS-Puffer für 10 min mit dem Fc-Blocker versetzt. Der Fc-Blocker diente dem Sättigen von Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, da das Binden der Antikörper sonst zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte. Für die Färbung der intrazellulären Antigene (IDO1, CD68, CD163, CD206) erfolgte nun die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern für 15 min. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen für 5 min in FACS-Puffer entfernt. Die Zellen wurden anschließend für die FACS-Analyse in 300  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert.

Tabelle 9 und 10 bieten eine Übersicht über die verwendeten Antikörper.

**Tabelle 9:** Antikörper des IDO1-Panels der durchflusszytometrischen Messung

Antikörper	Lokalisation des Antigens	Firma	Menge pro 10 <sup>6</sup> Zellen	Fluorochrom
<b>IDO1</b>	Intrazellulär	BioLegend	1 µl	AF647
<b>CD68</b>	Intrazellulär, zu einem geringen Teil auch extrazellulär	BioLegend	5 µl	PE
<b>CD163</b>	Intrazellulär, zu einem geringen Teil auch extrazellulär	BioLegend	5 µl	BV421
<b>CD326</b>	Extrazellulär	BioLegend	5 µl	FITC

Abkürzung: CD = cluster of differentiation

**Tabelle 10:** Antikörper des TREM2-Panels der durchflusszytometrischen Messung

Antikörper	Lokalisation des Antigens	Firma	Menge pro 10 <sup>6</sup> Zellen	Fluorochrom
<b>TREM2</b>	Extrazellulär	Novus Biologicals	2,5 µl	APC-Cy7
<b>CD68</b>	Intrazellulär, zu einem geringen Teil auch extrazellulär	BioLegend	5 µl	PE
<b>CD163</b>	Intrazellulär, zu einem geringen Teil auch extrazellulär	BioLegend	5 µl	BV421
<b>CD206</b>	Intrazellulär, zu einem geringen Teil auch extrazellulär	BioLegend	5 µl	AF647
<b>CD326</b>	Extrazellulär	BioLegend	5 µl	FITC

Abkürzung: CD = cluster of differentiation

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an dem Gerät FACS Verse durchgeführt. Es wurden 10.000 Zellen pro Probe gemessen.

## 4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 4.5.1 Grundlagen

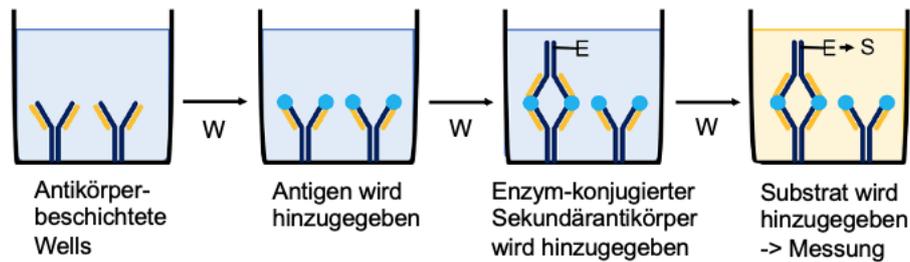
Mithilfe des enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ist die quantitative Bestimmung von Proteinen (u.a. Antikörper) und Viren, aber auch niedermolekularen Verbindungen wie Hormonen, Toxinen und Pestiziden in einer Probe möglich (Butler, 2000).

Hierbei wird die Eigenschaft spezifischer Antikörper genutzt, an einen bestimmten, den nachzuweisenden Stoff (Antigen), zu binden. Der Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert, dem Detektionsenzym, welches das jeweilige Substrat umsetzt, sodass es zu einem Farbumschlag kommt, der mithilfe einer photometrischen Messung nachgewiesen werden kann (Butler, 2000).

Für die Messung der sTREM2-Konzentration wurde ein Sandwich-ELISA verwendet, dessen grundsätzliche Durchführung im Folgenden erläutert wird.

Ein unmarkierter Antikörper (coat oder capture antibody) gegen das zu bestimmende Antigen wird auf die Oberfläche einer 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden. Die zu analysierende Probe sowie eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des zu analysierenden Antigens werden in die Wells hinzugegeben und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Jedes in der Probe vorhandene Antigen wird nun durch einen Antikörper fixiert. Die darauffolgenden Waschschriffe haben das Ziel, jegliche ungebundenen Bestandteile der Proben zu entfernen, sodass nur noch die an den Antikörper gebundenen Antigene zurückbleiben. Danach wird ein zweiter enzymgekoppelter monoklonaler Antikörper (sog. Detektionsantikörper) gegen das zu analysierende Antigen hinzugegeben, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (sog. Sandwich-Komplex) gebildet wird. Nach weiteren Waschschriffen zur Entfernung überschüssiger Detektionsantikörper wird ein farbloses Substrat hinzugegeben, das daraufhin durch das Enzym, welches an den Detektionsantikörper gekoppelt ist, umgesetzt wird, wobei ein Farbumschlag zu beobachten ist. Dieser wird anschließend photometrisch gemessen. Anhand des gemessenen Wertes kann die Konzentration des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes bestimmt werden, welche mit der in der Ausgangslösung enthaltenen Konzentration des zu bestimmenden Antigens korreliert (Engvall E, 2010; Kohl et Ascoli, 2017; Shah et Maghsoudlou, 2016).

Der Ablauf des Sandwich-ELISAs ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Ablauf eines sandwich-enzyme-linked immunosorbent assays (Sandwich-ELISAs).

Modifiziert nach Boguszewska et al., 2019.

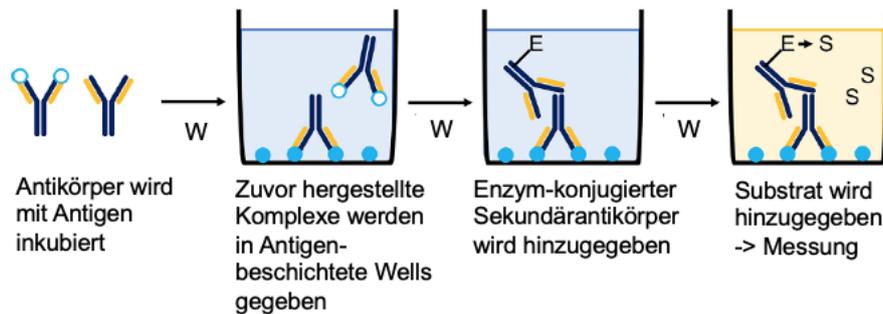
Abkürzungen: E = Enzym, S = Substrat, W = Waschschriff

Für die Bestimmung der Trp- und Kyn-Konzentrationen wurden sog. kompetitive Assays durchgeführt.

Beim kompetitiven Assay wird das zu bestimmende Antigen auf die Oberfläche einer 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden. Parallel dazu werden die zu analysierenden Proben sowie die Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des zu analysierenden Antigens mit gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörpern inkubiert (sog. Präzipitation). Anschließend wird die Lösung in die mit dem Antigen-beschichteten Wells hinzugegeben. Die Antikörper, die zuvor nicht an die in den Proben oder Kontrolllösungen enthaltenen Antigene binden konnten, binden nun an die an die Wells-gekoppelten Antigene. Hierauf folgen Waschschriffe, wodurch die nicht an die Wells-gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexe entfernt werden. Wie beim Sandwich-ELISA werden nun ein an ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper sowie das Substrat hinzugegeben, um eine Farbreaktion zu erhalten. Im Gegensatz zum Sandwich-ELISA ist der Farbumschlag hier jedoch umgekehrt proportional zu der in der Probe vorhandenen Antigenkonzentration (Engvall E, 2010; Kohl et Ascoli, 2017).

Beide Verfahren weisen eine hohe Sensitivität auf. Im Gegensatz zum Sandwich-ELISA hat das kompetitive Assay jedoch eine geringere Spezifität. Das kompetitive Assay eignet sich, wenn die nachzuweisenden Antigene so klein sind, dass sie nicht von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden werden können (Engvall E, 2010; Kohl et Ascoli, 2017).

Der Ablauf des kompetitiven ELISAs ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Ablauf eines kompetitiven enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Modifiziert nach Boguszewska et al., 2019.

Abkürzungen: E = Enzym, S = Substrat, W = Waschschritt

#### 4.5.2 Durchführung des Tryptophan-ELISAs

Die Trp-Konzentration im Serum wurde mithilfe des Tryptophan ELISA Kits (BA E-2700) entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Alle Materialien wurden zunächst auf RT gebracht. Für die Präzipitation wurden zunächst jeweils 20 µl der Proteinstandard-Verdünnungen, Proben und Kontrollen zusammen mit jeweils 200 µl PBS und 25 µl Präzipitationsreagenz in Mikroreaktionsgefäße gegeben und anschließend für 15 min bei 3000g zentrifugiert.

Es wurden jeweils 25 µl des klaren Überstandes in die Wells der Reaktionsplatte pipettiert. Hinzugegeben wurden pro Well 50 µl Äqualibrierungsreagenz sowie 10 µl D-Reagenz. Es folgte eine Inkubation auf dem Orbitalschüttler für 2 h bei RT (20°C, 600 rpm). Nachdem in jedes Well 100 µl des Q-Buffer hinzugegeben wurde, folgte eine Inkubationszeit von 10 min auf dem Orbitalschüttler (600 rpm). Jeweils 25 µl der Proteinstandard-Verdünnungen, Proben und Kontrollen wurden jeweils in ein Well der 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit jeweils 50 µl Trp-Antiserum vermischt. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Kühlschrank sowie am nächsten Tag drei Waschschritte. In jedes Well wurden anschließend 100 µl Enzymkonjugat gegeben und die Platte für 30 min auf dem Orbitalschüttler (600 rpm) inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden jeweils 100 µl Substratlösung in die Wells pipettiert und die Platte für 25 min auf dem Orbitalschüttler (600 rpm) inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden jeweils 100 µl Stop-Lösung in die Wells gegeben und die Platte kurz auf den Orbitalschüttler gelegt, um die Reagenzien zu vermengen. Anschließend folgte die photometrische Messung bei 450 nm mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes.

#### 4.5.3 Durchführung des Kynurenin-ELISAs

Die Kyn-Konzentration im Serum wurde mithilfe des Kynurenine ELISA Kits (BA E-2200) entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Alle Materialien wurden zunächst auf RT gebracht. In jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatte wurde jeweils 10 µl der Proben bzw. Proteinstandard-Verdünnungen, 250 µl Azylierungspuffer und 25 µl Azylierungsreagenz gegeben. Die Reagenzien wurden auf dem Orbitalschüttler (1 min, 600 rpm) gemischt und anschließend für 90 min bei 37°C inkubiert.

Von der zuvor hergestellten Mischung wurden anschließend jeweils 20 µl pro Well in die mit anti-Kyn-Antikörper beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Es wurde jeweils 50 µl des Kyn-Antiserums in jedes Well hinzugegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte geleert und die Wells jeweils mit 300 µl Waschpuffer viermal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Enzymkonjugats hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf dem Orbitalschüttler (600 rpm) und vier Waschschriffe. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl Substratlösung in die Wells pipettiert und diese für 20 min bei RT auf dem Orbitalschüttler (600 rpm) inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden jeweils 100 µl der Stop-Lösung in die Wells gegeben und die Platte kurz auf den Orbitalschüttler gelegt. Anschließend folgte die photometrische Messung bei 450 nm mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes.

#### 4.5.4 Durchführung des sTREM2-ELISAs

Die Konzentrationsbestimmung von sTREM2 im Serum ist mithilfe des TREM2 ELISA Kits (ab224881) entsprechend den Herstellerangaben erfolgt. Alle Materialien wurden zunächst auf RT gebracht. In jedes Well der bereits mit anti-TREM2-Antikörper beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte wurde jeweils 50 µl der Proben bzw. Proteinstandard-Verdünnungen gegeben und jeweils 50 µl der Antikörpermischung hinzugegeben. Anschließend folgte eine Inkubation für 1h auf dem Orbitalschüttler bei 400 rpm. Danach wurden die Wells dreimalig mit 350 µl pro Well gespült. Es wurden jeweils 100 µl der TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) Development Solution in jedes Well pipettiert und diese für 10 min im Dunkeln auf den Orbitalschüttler bei 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Stoplösung zu jedem Well hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für 1 min auf den Orbitalschüttler gelegt. Daraufhin erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes.

#### 4.5.5 Konzentrationsberechnungen der spektralphotometrisch analysierten Proben

Alle mithilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes gemessenen Absorptionen wurden in der Software SoftMax (Version Pro 7.1) über eine 4-Parameter-Funktion in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Dazu erfolgte zunächst der Abzug einer Nullwertprobe (Blank) von allen gemessenen Absorptionen. Die für die Proben jeweils ermittelten Konzentrationen wurden anschließend anhand der quantitativen Positivkontrollen nach Angaben des Herstellers bestimmt.

#### 4.6 Statistische Analyse der klinischen und histopathologischen Daten

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Softwares SPSS Statistics 27 (Statistical Package for the Social Sciences) und GraphPad Prism (Version 9.0.1 for Mac OS).

Die Patientencharakteristika wurden zunächst deskriptiv analysiert sowie im nächsten Schritt auf eine Korrelation mit der Expression des jeweiligen Markers untersucht. Hierfür wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's rank correlation coefficient, SRC) ist geeignet, um den nichtlinearen, aber monoton fallenden oder steigenden Zusammenhang zweier Merkmale zu berechnen. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) monotoner Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen.

Als Signifikanztest zweier ungepaarter Merkmale wurde der Student's t-Test mit Welch-Korrektur angewandt. Eine gaußsche Normalverteilung wurde aufgrund der geringen Probenanzahl nicht angenommen.

Mithilfe der one-way ANOVA wurden mehrere Stichproben miteinander verglichen. Dabei wird die Nullhypothese getestet, ob die jeweiligen Stichproben von der gleichen Grundgesamtheit stammen bzw. von Populationen, die gleiche Mittelwerte und Standardabweichungen aufweisen.

Für eine Beurteilung der Prognose wurden das progressionsfreie (d.h. Rezidiv des Tumors, lokoregionäre und/oder Fernmetastasen als erfasstes Ereignis bzw. „event“) und

das Gesamtüberleben (d.h. Tod jeder Ursache mit oder ohne Tumorerkrankung als erfasstes ungünstigstes Ereignis bzw. „event“) betrachtet.

Die Überlebenskurven wurden zensiert nach Kaplan-Meier berechnet und der Unterschied zwischen einer hohen und einer niedrigen Expression mithilfe des Log-Rank-Tests statistisch ermittelt.

Die Berechnung der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier ermöglicht auch die Berücksichtigung zensierter Daten. Als zensierte Daten werden Werte mit zunächst unbekanntem Eigenschaften definiert. Dabei handelt es sich entweder um Patienten, bei denen keins der zuvor beschriebenen Ereignisse aufgetreten ist oder die sich der weiteren Beobachtung entzogen haben (lost to follow-up).

Zur Überprüfung der prognostischen Relevanz klinischer und histopathologischer Marker im Hinblick auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben erfolgten zudem uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen mit Berechnung der Hazard Ratios (HR) und der 95% Konfidenzintervalle (95%CI).

Als Signifikanzniveau wurde für alle Testverfahren eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $\alpha=0,05$ ) festgelegt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur IDO1-Expression

Für die Untersuchung der IDO1-Expression in Epithelzellen und Immunzellen der Primärtumoren sowie Lymphknotenmetastasen wurden TMAs immunhistochemisch gefärbt.

Die Auswertung der epithelialen IDO1-Expression erfolgte anhand des gefärbten Anteils sowie dessen Farbeintensität. Die ermittelten Werte wurden multipliziert und in eine hohe und niedrige Expression klassifiziert. Die Abbildung 6 zeigt exemplarisch unterschiedlich starke epitheliale IDO1-Expressionen in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.

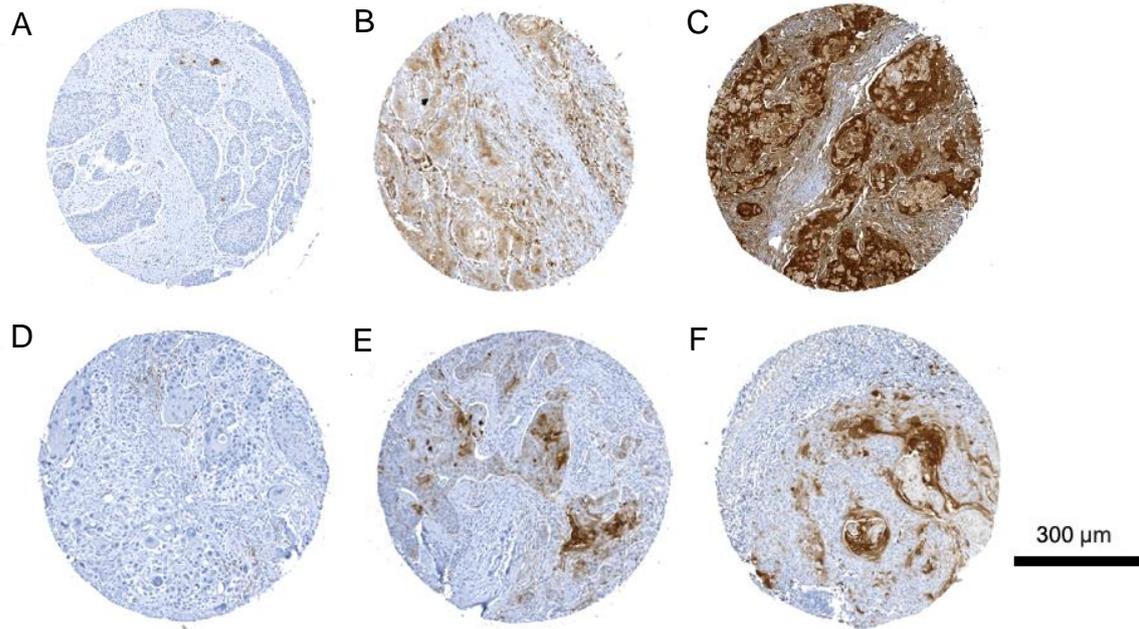
Für die Beurteilung der IDO1-Expression in Immunzellen wurde die Anzahl IDO1<sup>+</sup>-Immunzellen ermittelt. Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch unterschiedlich hohe IDO1-Expressionen in Immunzellen von Primärtumoren sowie Lymphknotenmetastasen.

Die Färbungen zur PD-L1- und PD-L2-Expression im gleichen Patientenkollektiv wurden in einer vorherigen Arbeit durchgeführt (Moratin et al., 2019). Die p16-Färbung sowie die In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von HPV-DNA wurden nach bereits veröffentlichten Protokollen vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes angefertigt (Kühn et al., 2021; Linxweiler et al., 2015).

Zur Ermittlung potentieller Korrelationen zwischen der IDO1-Expression und klinisch-histopathologischen Charakteristika wurde der SRC berechnet.

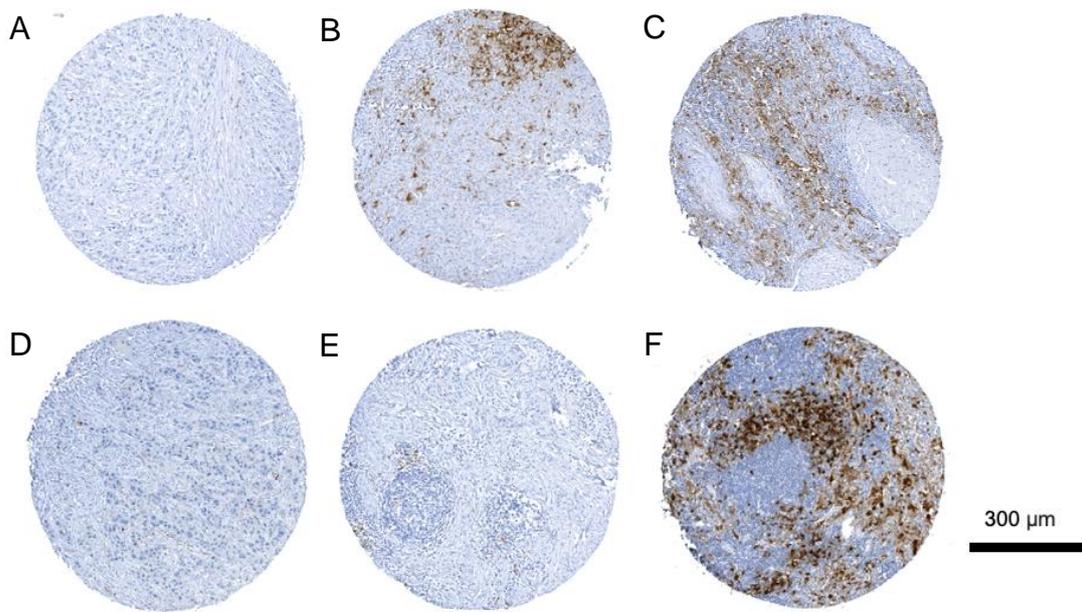
Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses der IDO1-Expression auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben erfolgte die Darstellung von Überlebenskurven nach Kaplan-Meier differenziert nach der IDO1-Expression sowie die Auswertung mittels Log-Rank-Tests.

Zur Überprüfung der prognostischen Relevanz der IDO1-Expression in Epithel- und Immunzellen sowie klinischer und weiterer histopathologischer Marker in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben erfolgten uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen mit Berechnung der HR und der 95%CI.



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung einer (A) niedrigen, (B) mittleren und (C) hohen IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen (D-E).

Der schwarze Balken repräsentiert 300  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 7:** Exemplarische Darstellung einer **(A)** niedrigen, **(B)** mittleren und **(C)** hohen IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumoren sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen **(D-E)**. Der schwarze Balken repräsentiert 300  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.1 IDO1-Expression in Primärtumoren

#### *5.1.1.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorpatientenkohorte*

Insgesamt wurden die Primärtumore von 171 Patienten retrospektiv auf ihre epitheliale IDO1-Expression untersucht.

Die Patientenkohorte setzte sich aus 66 (38,6%) Frauen und 105 (61,4%) Männern zusammen.

135 (78,9%) der Patienten waren  $\leq$  75 Jahre alt, wohingegen 36 (21,1%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumore wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert:

T1: 55 (32,2%), T2: 59 (34,5%), T3: 7 (4,1%), T4: 50 (29,2%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N0: 117 (68,4%), N1: 19 (11,1%), N2a: 1 (0,6%), N2b: 22 (12,9%), N2c: 12 (7,0%).

Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf.

Anhand der TNM-Klassifikation wurden die Patienten in die folgenden UICC-Stadien eingeteilt: UICC-Stadium I: 48 (28,1%), II: 39 (22,8%), III: 18 (10,5%), IV: 66 (38,6%).

Die Differenzierung der Tumore wurde wie folgt beurteilt: G1: 12 (7%), G2: 115 (67,3%), G3: 38 (22,2%).

45 (26,3%) der Tumore waren im Bereich des Mundbodens, 39 (22,8%) im Bereich der Zunge, 57 (33,3%) im Bereich des Unterkiefers, 3 (1,8%) im Bereich des Oberkiefers, einer im Bereich der Unterlippe (0,6%), 12 (7%) im Bereich des Weichgaumens und 10 (5,8%) im Bereich des Planum buccale lokalisiert.

Bei 34 (19,9%) der Patienten ist nach der primären Tumorresektion und Neck Dissection sowie der im Falle von Risikofaktoren nach Leitlinie durchgeführten adjuvanten Therapie ein Rezidiv aufgetreten. Im Gegensatz dazu waren 137 (80,1%) der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung rezidivfrei.

59 (34,5%) wiesen eine hohe p16-Expression auf, wohingegen 88 (51,5%) der Tumoren p16-negativ waren.

In keinem der Tumore ließ sich HPV-DNA nachweisen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorte ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften innerhalb der analysierten Kohorte

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)
<b>Geschlecht</b>	
<b>Männlich</b>	105 (61,4)
<b>Weiblich</b>	66 (38,6)
<b>Alter</b>	
<b>≤ 75 Jahre</b>	135 (78,9)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	36 (21,1)
<b>T-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	55 (32,2)
<b>2</b>	59 (34,5)
<b>3</b>	7 (4,1)
<b>4</b>	50 (29,2)
<b>N-Klassifikation</b>	
<b>0</b>	117 (68,4)
<b>1</b>	19 (11)
<b>2a</b>	1 (0,6)
<b>2b</b>	22 (12,9)
<b>2c</b>	12 (7,0)
<b>M-Klassifikation</b>	
<b>0</b>	171 (100)
<b>1</b>	0 (0)
<b>UICC-Stadium</b>	
<b>I</b>	48 (28,1)
<b>II</b>	39 (22,8)
<b>III</b>	18 (10,5)
<b>IV</b>	66 (38,6)
<b>Grading</b>	
<b>1</b>	12 (7,0)
<b>2</b>	115 (67,3)
<b>3</b>	38 (22,2)
<b>Fehlend</b>	6 (3,5)
<b>Rezidiv</b>	
<b>Ja</b>	34 (19,9)
<b>Nein</b>	137 (80,1)
<b>Lokalisation</b>	
<b>Mundboden</b>	45 (26,3)
<b>Zunge</b>	39 (22,8)
<b>Unterkiefer</b>	57 (33,3)
<b>Oberkiefer</b>	3 (1,8)
<b>Unterlippe</b>	1 (0,6)
<b>Weichgaumen</b>	12 (7)
<b>Planum buccale</b>	10 (5,8)
<b>Fehlend</b>	3 (1,7)
<b>p16</b>	

## Ergebnisse

---

	<b>Positiv</b>	59 (34,5)
	<b>Negativ</b>	88 (51,5)
	<b>Fehlend</b>	24 (14)
<b>HPV-DNA</b>		
	<b>Negativ</b>	154 (90,1)
	<b>Fehlend</b>	17 (9,9)

Abkürzungen: DNA = desoxyribonucleinacid; HPV = Humane Papillomaviren; UICC = Union internationale contre le cancer

### *5.1.1.2 Korrelation der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore mit klinischen und histopathologischen Parametern*

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der IDO1-Expression in Epithelzellen von Primärtumoren zeigte sich eine positive signifikante Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht ( $p=0,046$ ).

Ein Patientenalter  $\leq 75$  Jahre wies eine positive Korrelation mit der epithelialen IDO1-Expression auf ( $p=0,017$ ).

Zudem konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen einer höheren Einteilung in der T- und N-Klassifikation und damit ebenfalls den höheren UICC-Stadien mit einer geringeren epithelialen IDO1-Expression beobachtet werden (alle  $p<0,001$ ).

Das Auftreten eines Rezidivs korrelierte signifikant mit einer höheren IDO1-Expression ( $p=0,021$ ).

Es konnte keine Korrelation zwischen der IDO1-Expression und dem Grading des Primärtumors beobachtet werden ( $p=0,498$ ).

Tumore, welche im Bereich des Mundbodens, der Zunge oder des Unterkiefers lokalisiert waren, wiesen eine hochsignifikant höhere epitheliale IDO1-Expression auf ( $p<0,001$ ).

Zudem korrelierte die IDO1-Expression mit der PD-L1- und PD-L2-Expression im Primärtumor (beide  $p<0,001$ ).

Es konnte keine Korrelation zwischen der IDO1-Expression und der p16-Expression gefunden ( $p=0,137$ ).

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore mit klinischen und histopathologischen Parametern sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12:** Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore

Charakteristika		Niedrige IDO1-Expression (%)	Hohe IDO1 Expression (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	64 (61,1)	41 (39)	0,046*
	Weiblich	50 (75,8)	16 (24,2)	
Alter	≤ 75 Jahre	96 (71,1)	39 (28,9)	0,017*
	> 75 Jahre	18 (50)	18 (50)	
T-Klassifikation	1	46 (83,6)	9 (16,4)	<0,001*
	2	41 (69,5)	18 (30,5)	
	3	4 (57,1)	3 (42,9)	
	4	23 (46)	27 (54)	
N-Klassifikation	0	89 (76,1)	28 (23,9)	<0,001*
	1	11 (57,9)	8 (42,1)	
	2a	0 (0)	1 (100)	
	2b	9 (40,9)	13 (59,1)	
	2c	5 (41,7)	7 (58,3)	
UICC-Stadium	I	41 (85,4)	7 (14,6)	<0,001*
	II	32 (82,1)	7 (17,9)	
	III	10 (55,6)	8 (44,4)	
	IV	31 (47)	35 (53)	
Rezidiv	Ja	97 (70,8)	40 (29,2)	0,021*
	Nein	17 (50)	17 (50)	
Grading	1	12 (100)	0 (0)	0,498
	2	73 (63,5)	42 (36,5)	
	3	26 (68,4)	12 (31,6)	
	Fehlend	3 (50)	3 (50)	
Lokalisation	Mundboden	38 (84,4)	7 (15,6)	<0,001*
	Zunge	29 (74,4)	10 (25,6)	
	Oberkiefer	35 (61,4)	22 (38,6)	
	Unterkiefer	1 (33,3)	2 (66,7)	
	Unterlippe	1 (100)	0 (0)	
	Weichgaumen	7 (58,3)	5 (41,7)	
	Planum buccale	2 (20)	8 (80)	
	Fehlend	1 (25)	3 (75)	
PD-L1	Negativ	23 (74,2)	8 (25,8)	<0,001*
	Positiv	38 (74,5)	13 (25,5)	
	Fehlend	53 (59,6)	36 (40,4)	
PD-L2	Negativ	42 (93,3)	3 (6,7)	<0,001*
	Positiv	65 (58)	47 (42)	
	Fehlend	7 (50)	7(50)	
p16	Negativ	19 (73,1)	7 (26,9)	0,137
	Positiv	84 (66,1)	43 (33,9)	
	Fehlend	11 (61,1)	7 (38,9)	

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau <0,05

Abkürzungen: PD-L 1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

### *5.1.1.3 Korrelation der IDO1-Expression in Immunzellen des Primärtumors mit klinischen und histopathologischen Parametern*

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore zeigte sich eine positive Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht ( $p=0,006$ ).

Zudem korrelierte ein höheres Alter ( $> 75$  Jahre) mit einer höheren IDO1-Expression ( $p=0,019$ ).

Tumore, welche histopathologisch einer höheren T- ( $p=0,010$ ) oder N-Klassifikation ( $p=0,008$ ) zugeordnet und dementsprechend in ein höheres UICC-Stadium ( $p=0,026$ ) eingeteilt wurden, wiesen eine positive Korrelation mit der IDO1-Expression in Immunzellen auf.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading des Tumors ( $p=0,932$ ), dem Auftreten eines Rezidivs ( $p=0,100$ ), der Lokalisation der Tumore ( $p=0,067$ ) sowie der PD-L1- ( $p=0,745$ ), PD-L2- ( $p=0,335$ ) und p16-Expression ( $p=0,971$ ) mit der IDO1-Expression in Immunzellen beobachtet werden.

**Tabelle 13:** Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore

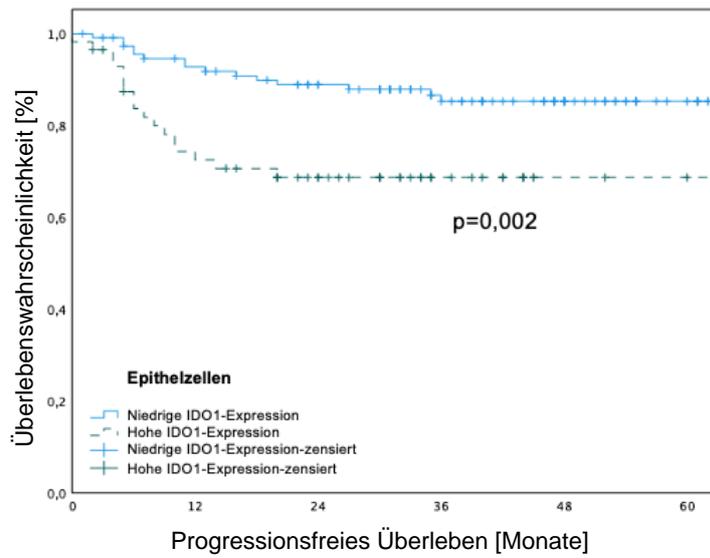
Charakteristika		Niedrige IDO1-Expression (%)	Hohe IDO1-Expression (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	49 (56,2)	46 (43,8)	0,006*
	Weiblich	23 (34,8)	43 (65,2)	
Alter	≤ 75 Jahre	71 (52,6)	64 (47,4)	0,019*
	> 75 Jahre	11 (30,6)	25 (69,4)	
T-Klassifikation	1	32 (58,2)	23 (41,8)	0,010*
	2	30 (50,8)	29 (49,2)	
	3	4 (57,1)	3 (42,9)	
	4	16 (32)	34 (68)	
N-Klassifikation	0	63 (53,8)	54 (46,2)	0,008*
	1	11 (57,9)	8 (41,1)	
	2a	0 (0)	1 (100)	
	2b	5 (22,7)	17 (77,3)	
	2c	3 (25)	9 (75)	
UICC-Stadium	I	28 (58,3)	20 (41,7)	0,026*
	II	21 (53,8)	18 (46,2)	
	III	11 (61,1)	7 (38,9)	
	IV	22 (33,3)	44 (66,7)	
Rezidiv	Ja	70 (51,1)	67 (48,9)	0,100
	Nein	12 (25,3)	22 (64,7)	
Grading	1	7 (58,3)	5 (41,7)	0,932
	2	53 (46,1)	62 (53,9)	
	3	19 (50)	19 (50)	
	Fehlend	3 (50)	3 (50)	
Lokalisation	Mundboden	26 (57,8)	19 (42,2)	0,067
	Zunge	25 (64,1)	14 (35,9)	
	Unterkiefer	20 (25,1)	37 (64,9)	
	Oberkiefer	1 (33,3)	2 (66,7)	
	Unterlippe	0 (0)	1 (100)	
	Weichgaumen	6 (50)	6 (50)	
	Planum buccale	4 (40)	6 (60)	
	Fehlend	0 (0)	4 (100)	
PD-L1	Negativ	23 (51,1)	22 (48,9)	0,745
	Positiv	54 (48,2)	58 (51,8)	
	Fehlend	5 (35,8)	9 (64,3)	
PD-L2	Negativ	15 (57,7)	11 (42,3)	0,335
	Positiv	60 (47,2)	67 (52,8)	
	Fehlend	7 (38,9)	11 (61,1)	
p16	Negativ	40 (45,4)	48 (54,5)	0,971
	Positiv	27 (45,8)	32 (54,2)	
	Fehlend	15 (62,5)	9 (37,5)	

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau <0,05

Abkürzungen: PD-L1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

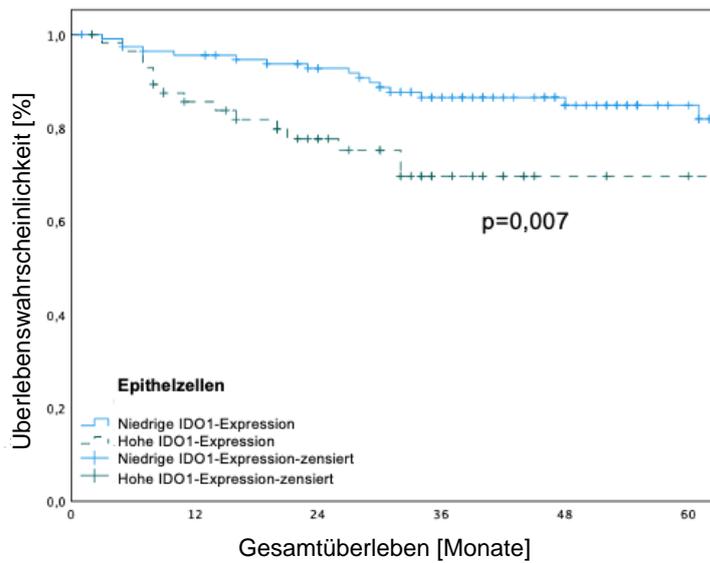
*5.1.1.4 Einfluss der IDO1-Expression in Epithelzellen des Primärtumors auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patientenkohorte*

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abbildung 8 zeigen, dass Patienten mit einer hohen epithelialen IDO1-Expression ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben aufwiesen ( $p=0,002$ ). Zudem überlebten Patienten, deren Primärtumore eine hohe epitheliale IDO1-Expression zeigten, signifikant kürzer ( $p=0,007$ ).



Anzahl:

Niedrige IDO1-Expression	114	100	95	72	51	30
Hohe IDO1-Expression	57	45	35	17	6	5



Anzahl:

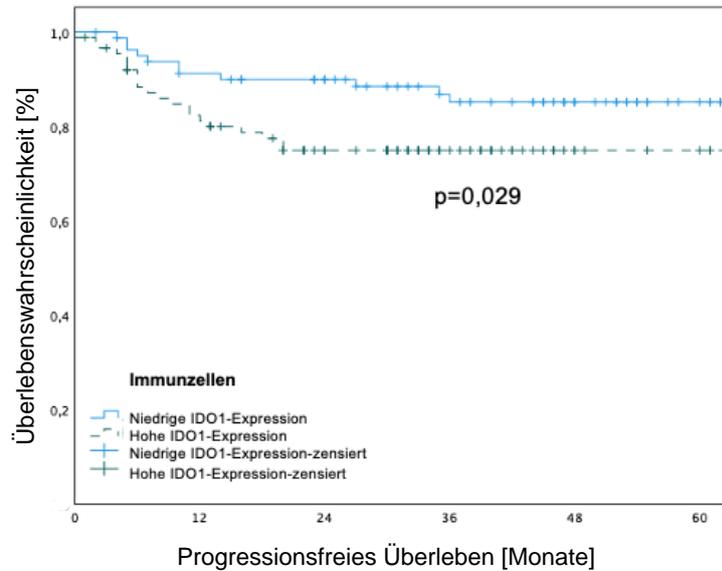
Niedrige IDO1-Expression	114	06	87	68	48	27
Hohe IDO1-Expression	57	40	30	15	5	4

**Abbildung 8:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten.

*5.1.1.5 Einfluss der IDO1-Expression in Immunzellen des Primärtumors auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patientenkohorte*

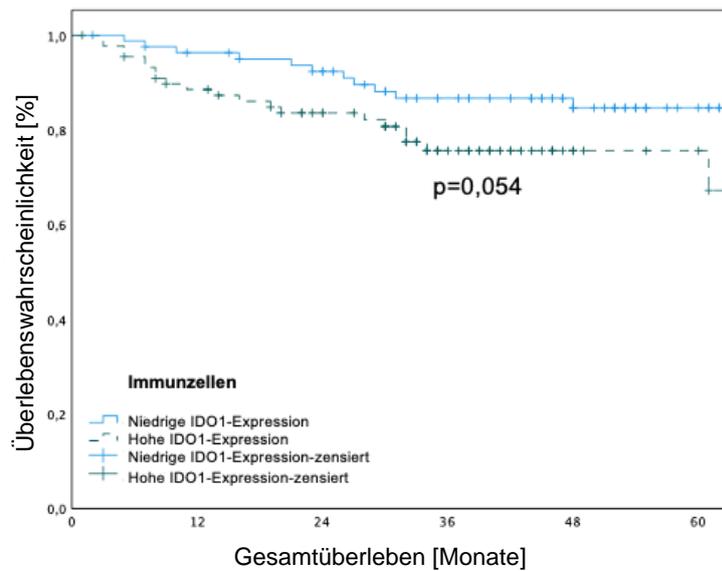
Wie in Abbildung 9 dargestellt, verzeichneten Patienten mit einer hohen IDO1-Expression in Immunzellen einen signifikant früheren Tumorprogress ( $p=0,029$ ).

Zudem überlebten Patienten, deren Primärtumoren eine hohe Anzahl von IDO1<sup>+</sup>-Immunzellen aufwiesen, deutlich kürzer. Der Unterschied zwischen der Patientenkohorte mit einer hohen Anzahl und der mit einer niedrigen Anzahl IDO1<sup>+</sup>-Immunzellen war annähernd signifikant ( $p=0,054$ ).



Anzahl:

Niedrige IDO1-Expression	82	71	65	52	39	23
Hohe IDO1-Expression	89	69	52	29	12	8



Anzahl:

Niedrige IDO1-Expression	82	76	69	56	43	25
Hohe IDO1-Expression	89	75	61	33	14	9

**Abbildung 9:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens bei einer differenziert nach der IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten.

#### *5.1.1.6 Uni- und Multivariatanalyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens*

Die univariate Analyse zeigte einen signifikanten Einfluss der IDO1-Expression in Epithelzellen (HR: 2,544; 95%CI: 1,459-5,139;  $p=0,009$ ), der IDO1-Expression in Immunzellen (HR: 1,483; 95%CI: 1,029-2,137;  $p=0,029$ ) sowie des UICC-Stadiums (HR: 2,43; 95%CI: 1,190-4,962;  $p=0,012$ ) auf das progressionsfreie Überleben.

Die IDO1-Expression in Epithelzellen (HR: 2,817; 95%CI: 1,428-5,558;  $p=0,003$ ) und das UICC-Stadium (HR: 2,876; 95%CI: 1,355-6,102;  $p=0,004$ ) konnten in der Univariat-Analyse als signifikante Einflussparameter auf das Gesamtüberleben identifiziert werden. Auch die IDO1-Expression in Immunzellen wies einen nahezu signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben auf (HR: 1,428; 95%CI: 0,985-2,070;  $p=0,054$ ). Die Ergebnisse der Univariat-Analyse sind in Tabelle 14 dargestellt.

In der Multivariat-Analyse zeigten die IDO1-Expression in Epithelzellen (HR: 2,073; 95%CI: 0,959-4,479;  $p=0,064$ ) sowie die IDO1-Expression in Immunzellen (HR: 1,416; 95%CI: 0,967-2,074;  $p=0,074$ ) einen annähernd signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben. Zudem wies das UICC-Stadium einen annähernd signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben auf (HR: 2,219; 95%CI: 0,990-4,973;  $p=0,053$ ). Die Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Multivariat-Analyse.

**Tabelle 14:** Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der IDO1-Expression in Primärtumoren

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
Geschlecht	Weiblich vs. männlich	1,032 (0,501-2,127)	0,932	0,867 (0,426-1,764)	0,693
Alter	≤ 75 Jahre vs. > 75 Jahre	1,644 (0,732-3,693)	0,135	1,140 (0,492-2,640)	0,601
UICC-Stadium	I/II vs. III/IV	2,876 (1,355-6,102)	0,004*	2,43 (1,190-4,962)	0,012*
IDO1-Expression in Epithelzellen	Hoch vs. niedrig	2,817 (1,428-5,558)	0,003*	2,544 (1,259-5,139)	0,009*
IDO1-Expression in Immunzellen	Hoch vs. niedrig	1,428 (0,985-2,070)	0,054	1,483 (1,029-2,137)	0,029*

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

**Tabelle 15:** Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der IDO1-Expression in Primärtumoren

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
Geschlecht	Weiblich vs. männlich	0,893 (0,415-1,920)	0,771	0,789 (0,374-1,665)	0,533
Alter	≤ 75 Jahre vs. > 75 Jahre	1,327 (0,574-3,067)	0,509	0,838 (0,352-1,997)	0,690
UICC-Stadium	I/II vs. III/IV	2,219 (0,990-4,973)	0,053	1,731 (0,791-3,789)	0,170
IDO1-Expression in Epithelzellen	Hoch vs. niedrig	1,696 (0,781-3,687)	0,182	2,073 (0,959-4,479)	0,064
IDO1-Expression in Immunzellen	Hoch vs. niedrig	1,296 (0,880-1,908)	0,189	1,416 (0,967-2,074)	0,074

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

## 5.1.2 IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen

### *5.1.2.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der nodal-positiven Patientenkohorte*

Insgesamt wurden die Lymphknotenmetastasen von 40 Patienten retrospektiv hinsichtlich ihrer IDO1-Expression untersucht.

Die Patientenkohorte setzte sich aus 12 (30%) Frauen und 28 (70%) Männern zusammen. 33 (82,5%) der Patienten waren  $\leq$  75 Jahre alt, wohingegen 7 (17,5%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumore wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert:

T1: 6 (15%), T2: 15 (37,5%), T3: 4 (10%), T4: 15 (37,5%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N1: 13 (32,5%), N2b: 18 (45%), N2c: 8 (20%), N3: 1 (2,5%).

Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf.

Anhand der TNM-Klassifikation wurden 9 (22,5%) der Patienten in das UICC-Stadium III und 31 (77,5%) der Patienten in das UICC-Stadium IV eingeteilt.

Die Differenzierung der Tumore wurde wie folgt beurteilt: G2: 29 (72,5%), G3: 10 (25%).

7 (17,5%) der Tumore waren im Bereich des Mundbodens, 12 (30%) im Bereich der Zunge, 12 (30%) im Bereich des Unterkiefers, einer (2,5%) im Bereich des Oberkiefers, 2 (5%) im Bereich des Weichgaumens und 4 (10%) im Bereich des Planum buccale lokalisiert.

Bei 12 (30%) der Patienten ist nach der primären Tumorresektion und Neck Dissection sowie der im Falle von Risikofaktoren nach Leitlinie durchgeführten adjuvanten Therapie ein Rezidiv aufgetreten. Im Gegensatz dazu waren 28 (70%) der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung rezidivfrei.

10 (25%) wiesen eine hohe p16-Expression auf, wohingegen 13 (32,5%) der Tumoren p16-negativ waren.

In keinem der Tumore ließ sich HPV-DNA nachweisen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorte ist in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16:** Auflistung der klinischen und histopathologischen Parameter innerhalb der analysierten Kohorte mit Lymphknotenmetastasen

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)
<b>Geschlecht</b>	
<b>Männlich</b>	28 (70)
<b>Weiblich</b>	12 (30)
<b>Alter</b>	
<b>≤ 75 Jahre</b>	33 (82,5)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	7 (17,5)
<b>T-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	6 (15)
<b>2</b>	15 (37,5)
<b>3</b>	4 (10)
<b>4</b>	15 (37,5)
<b>N-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	13 (32,5)
<b>2b</b>	18 (45)
<b>2c</b>	8 (20)
<b>3</b>	1 (2,5)
<b>M-Klassifikation</b>	
<b>0</b>	40 (100)
<b>1</b>	0 (0)
<b>UICC-Stadium</b>	
<b>III</b>	9 (22,5)
<b>IV</b>	31 (77,5)
<b>Grading</b>	
<b>2</b>	29 (72,5)
<b>3</b>	10 (25)
<b>Fehlend</b>	1 (2,5)
<b>Lokalisation</b>	
<b>Mundboden</b>	7 (17,5)
<b>Zunge</b>	12 (30)
<b>Unterkiefer</b>	12 (30)
<b>Oberkiefer</b>	1 (2,5)
<b>Weichgaumen</b>	2 (5)
<b>Planum buccale</b>	4 (10)
<b>Fehlend</b>	2 (5)
<b>Rezidiv</b>	
<b>Ja</b>	12 (30)
<b>Nein</b>	28 (70)
<b>p16</b>	
<b>Positiv</b>	10 (25)
<b>Negativ</b>	13 (32,5)
<b>Fehlend</b>	17 (42,5)
<b>HPV-DNA</b>	
<b>Negativ</b>	33 (82,5)
<b>Fehlend</b>	7 (17,5)

Abkürzungen: DNA = desoxyribonucleinacid; HPV = Humane Papillomaviren; UICC = Union internationale contre le cancer

### *5.1.2.2 Korrelation der IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen mit klinischen und histopathologischen Parametern*

Die Korrelationsanalyse zeigte eine signifikante Assoziation des weiblichen Geschlechts mit einer hohen epithelialen IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen ( $p=0,039$ ).

Im weiteren konnte keine signifikante Korrelation zwischen der epithelialen IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen und dem Alter ( $\leq 75$  und  $> 75$  Jahre,  $p=0,101$ ), der TumorgroÙe und -infiltration (T-Klassifikation,  $p=0,228$ ), dem Lymphknotenstatus (N-Klassifikation,  $p=0,342$ ), dem UICC-Stadium ( $p=0,462$ ), dem Auftreten eines Rezidivs ( $p=0,160$ ), dem Differenzierungsgrad des Tumors ( $p=0,353$ ), der Lokalisation des Tumors ( $p=0,771$ ), der PD-L1- ( $p=0,869$ ), der PD-L2- ( $p=0,657$ ) und der p16-Expression ( $p=0,100$ ) gefunden werden.

**Tabelle 17:** Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen

Charakteristika		Hohe IDO1-Expression (%)	Niedrige IDO1-Expression (%)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Männlich</b>	20 (71,4)	8 (28,6)	0,039*
	<b>Weiblich</b>	12 (100)	0 (0)	
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre</b>	28 (84,8)	5 (15,2)	0,101
	<b>&gt; 75 Jahre</b>	4 (57,1)	3 (42,9)	
<b>T-Klassifikation</b>	<b>1</b>	5 (83,3)	1 (16,7)	0,228
	<b>2</b>	10 (66,7)	5 (33,3)	
	<b>3</b>	3 (75)	1 (25)	
	<b>4</b>	14 (93,3)	1 (6,7)	
<b>N-Klassifikation</b>	<b>1</b>	12 (92,3)	1 (7,7)	0,342
	<b>2b</b>	13 (72,2)	5 (27,8)	
	<b>2c</b>	6 (75)	2 (25)	
	<b>3</b>	1 (100)	0 (0)	
<b>UICC-Stadium</b>	<b>III</b>	8 (88,9)	1 (11,1)	0,462
	<b>IV</b>	24 (77,4)	7 (22,6)	
<b>Rezidiv</b>	<b>Nein</b>	24 (85,7)	4 (14,3)	0,160
	<b>Ja</b>	8 (66,6)	4 (33,3)	
<b>Grading</b>	<b>2</b>	22 (75,9)	7 (24,1)	0,353
	<b>3</b>	9 (90)	1 (10)	
	<b>Fehlend</b>	1 (100)		
<b>Lokalisation</b>	<b>Mundboden</b>	5 (71,4)	2 (28,6)	0,771
	<b>Zunge</b>	10 (83,3)	2 (16,7)	
	<b>Unterkiefer</b>	9 (75)	3 (25)	
	<b>Oberkiefer</b>	1 (100)	0 (0)	
	<b>Weichgaumen</b>	2 (100)	0 (0)	
	<b>Planum buccale</b>	3 (75)	1 (25)	
	<b>Fehlend</b>	2 (100)	0 (0)	
<b>PD-L1</b>	<b>Negativ</b>	4 (80)	1 (20)	0,869
	<b>Positiv</b>	15 (83,3)	3 (16,7)	
	<b>Fehlend</b>	13 (76,5)	4 (23,5)	
<b>PD-L2</b>	<b>Negativ</b>	1 (100)	0 (0)	0,657
	<b>Positiv</b>	18 (81,8)	4 (18,2)	
	<b>Fehlend</b>	13 (76,5)	4 (23,5)	
<b>p16</b>	<b>Negativ</b>	13 (100)	0 (0)	0,100
	<b>Positiv</b>	6 (60)	4 (40)	
	<b>Fehlend</b>	13 (76,5)	4 (23,5)	

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05; Abkürzungen: PD-L1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

### *5.1.2.3 Korrelation der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen mit klinischen und histopathologischen Parametern*

Die Lokalisation der Primärtumore im Bereich des Mundbodens, der Zunge und des Unterkiefers war mit einer niedrigen IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen assoziiert ( $p=0,006$ ).

Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und einer hohen IDO1-Expression in Immunzellen beobachtet werden ( $p=0,038$ ).

Das weibliche Geschlecht wies eine positive Korrelation mit der IDO1-Expression in Immunzellen auf. Die Korrelation erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau ( $p=0,079$ ).

Im Weiteren konnte keine signifikante Korrelation zwischen der IDO1-Expression in Immunzellen und dem Alter ( $\leq 75$  und  $> 75$  Jahre,  $p=0,946$ ), der T-Klassifikation ( $p=0,477$ ), der N-Klassifikation ( $p=0,387$ ), dem UICC-Stadium ( $p=0,696$ ), dem Grading des Tumors ( $p=0,145$ ), der PD-L1- ( $p=0,587$ ), der PD-L2- ( $p=0,521$ ) und der p16-Expression ( $p=0,199$ ) gezeigt werden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf IDO1-Expression in Immunzellen von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden ( $p=0,083$ ).

**Tabelle 18:** Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen

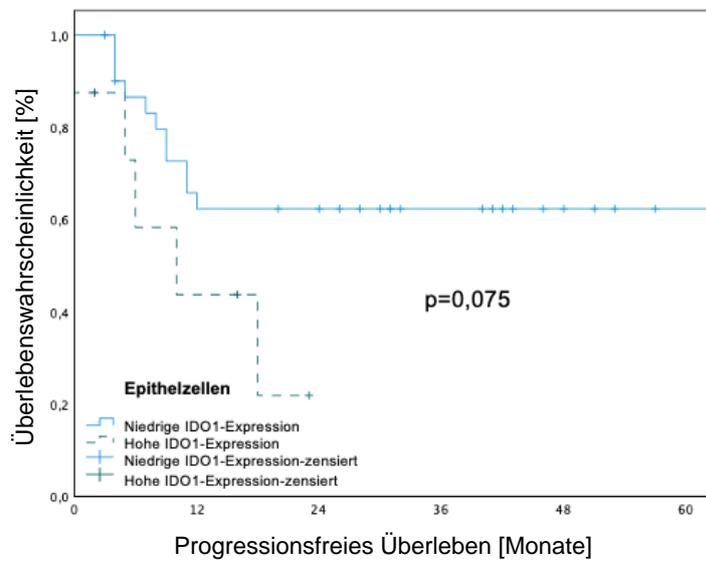
Charakteristika		Niedrige IDO1-Expression (%)	Hohe IDO1-Expression (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	18 (64,3)	10 (35,7)	0,079
	Weiblich	11 (91,7)	1 (8,3)	
Alter	≤ 75 Jahre	24 (72,7)	9 (27,3)	0,946
	> 75 Jahre	5 (71,4)	2 (28,6)	
T-Klassifikation	1	5 (83,3)	1 (16,7)	0,477
	2	11 (73,3)	4 (26,7)	
	3	3 (75)	1 (25)	
	4	10 (66,6)	5 (33,3)	
N-Klassifikation	1	9 (69,2)	4 (30,8)	0,387
	2b	12 (66,7)	6 (33,3)	
	2c	7 (87,5)	1 (12,5)	
	3	1 (100)	0 (0)	
UICC-Stadium	III	7 (77,8)	2 (22,2)	0,696
	IV	22 (71)	9 (29)	
Grading	2	19 (65,5)	10 (34,5)	0,145
	3	9 (90)	1 (10)	
	Fehlend	1 (100)	0 (0)	
Rezidiv	Ja	6 (50)	6 (50)	0,038*
	Nein	23 (82,1)	5 (17,9)	
Lokalisation	Mundboden	7 (100)	0 (0)	0,006
	Zunge	10 (83,3)	2 (16,7)	
	Unterkiefer	8 (66,7)	4 (33,3)	
	Oberkiefer	1 (100)	0 (0)	
	Weichgaumen	1 (50)	1 (50)	
	Planum buccale	1 (25)	3 (75)	
	Fehlend	1 (50)	1 (50)	
PD-L1	Negativ	4 (80)	1 (20)	0,587
	Positiv	12 (66,7)	6 (33,3)	
	Fehlend	13 (76,5)	4 (23,5)	
PD-L2	Negativ	1 (100)	0 (0)	0,521
	Positiv	15 (68,2)	7 (31,8)	
	Fehlend	13 (76,5)	4 (23,5)	
p16	Negativ	11 (84,6)	2 (15,4)	0,199
	Positiv	6 (60)	4 (40)	
	Fehlend	12 (70,6)	5 (29,4)	

Abkürzungen: PD-L 1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

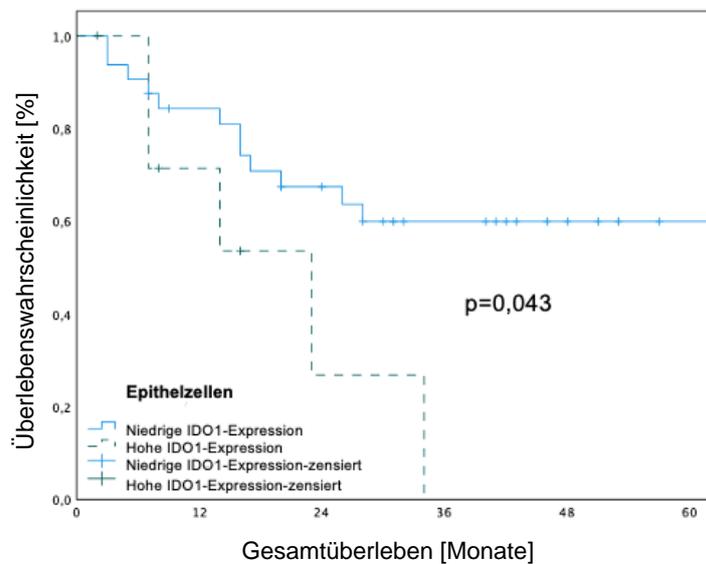
*5.1.2.3 Einfluss der IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben*

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wiesen Patienten mit einer hohen epithelialen, intrametastastischen IDO1-Expression ein kürzeres progressionsfreies Überleben auf, der Unterschied war jedoch nur annähernd signifikant ( $p=0,075$ ).

Patienten, deren Lymphknotenmetastasen eine hohe epitheliale IDO1-Expression aufwiesen, lebten signifikant kürzer ( $p=0,043$ ).



Anzahl:						
Niedrige IDO1-Expression	32	19	17	10	5	1
Hohe IDO1-Expression	8	3	0	0	0	0

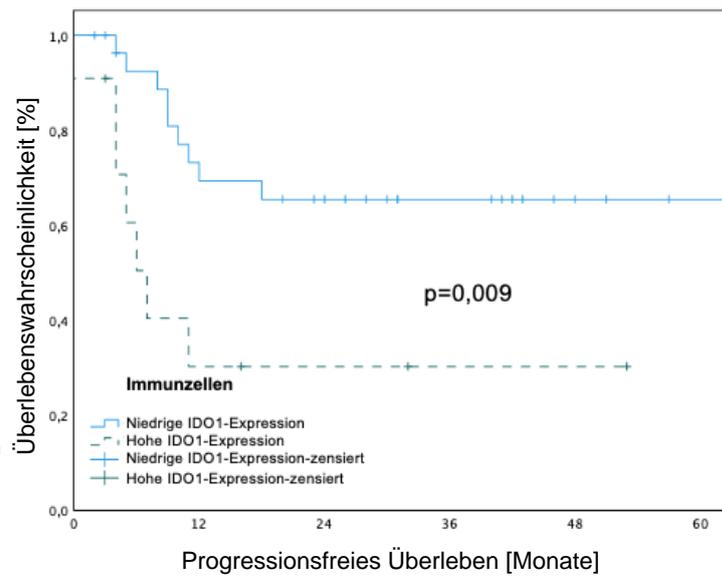


Anzahl:						
Niedrige IDO1-Expression	32	25	19	11	6	2
Hohe IDO1-Expression	8	4	1	0	0	0

**Abbildung 10:** Graphische Darstellung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens differenziert nach der IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten.

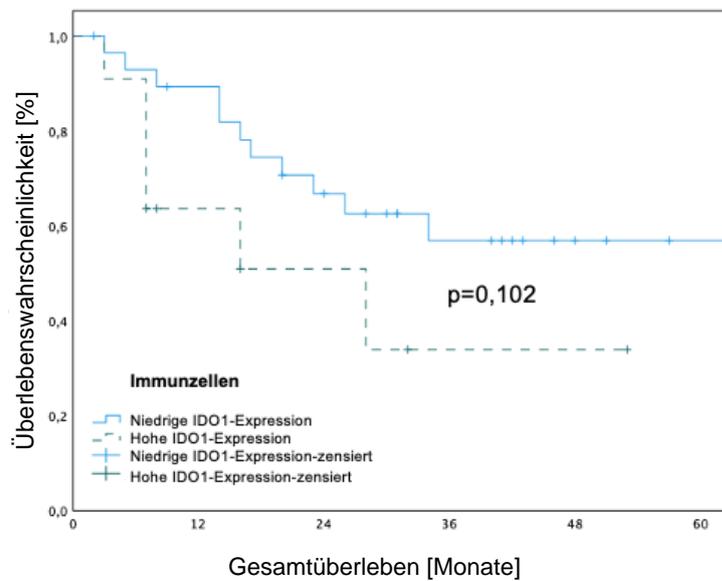
*5.1.2.4 Einfluss der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben*

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abbildung 11 zeigen, dass Patienten mit einer hohen IDO1-Expression in den Immunzellen der Lymphknotenmetastasen ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben aufwiesen ( $p=0,009$ ). Zudem überlebten Patienten, deren intrametastatische Immunzellen eine hohe IDO1-Expression zeigten, kürzer. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,102$ ).



Anzahl:  
Niedrige IDO1-  
Expression  
Hohe IDO1-  
Expression

	0	12	24	36	48	60
Niedrige IDO1-Expression	29	19	15	9	4	1
Hohe IDO1-Expression	11	3	2	1	1	0



Anzahl:  
Niedrige IDO1-  
Expression  
Hohe IDO1-  
Expression

	0	12	24	36	48	60
Niedrige IDO1-Expression	29	24	17	10	5	2
Hohe IDO1-Expression	11	5	3	1	1	0

**Abbildung 11:** Graphische Darstellung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens differenziert nach der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten.

#### *5.1.2.5 Uni- und Multivariatanalyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens der nodal-positiven Patientenkohorte*

Im Rahmen der Univariat-Analyse konnte die IDO1-Expression in intrametastatischen Immunzellen als signifikanter Einflussfaktor auf das progressionsfreie Überleben identifiziert werden (HR: 1,859; 95%CI: 0,127-3,066;  $p=0,009$ ). Die IDO1-Expression in intrametastatischen Epithelzellen (HR: 2,511; 95%CI: 0,869-7,26;  $p=0,075$ ) sowie das Alter (HR: 2,646; 95%CI: 1,30-10,219;  $p=0,057$ ) wiesen ebenfalls einen starken und nahezu signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben auf.

In der Univariat-Analyse zeigte die IDO1-Expression in Epithelzellen in Bezug auf das Gesamtüberleben einen signifikanten Einfluss (HR: 2,830; 95%CI: 0,976-8,212;  $p=0,043$ ). In der Multivariat-Analyse konnten die IDO1-Expression in Immunzellen als signifikanter, unabhängiger Einflussfaktor auf das progressionsfreie Überleben bestätigt werden (HR: 1,951; 95%CI: 1,079-3,528;  $p=0,027$ ).

In der Multivariat-Analyse für das Gesamtüberleben stellte sich keiner der klinischen und histopathologischen Einflussfaktoren als signifikant dar.

Die Ergebnisse der Univariat- und Multivariatanalyse sind in den Tabellen 19 und 20 dargestellt.

**Tabelle 19:** Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Parametern sowie der IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Weiblich vs. männlich</b>	0,39 (0,112-1,358)	0,121	0,605 (0,195-1,880)	0,374
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	2,322 (0,726-7,423)	0,139	2,646 (1,30-10,219)	0,057
<b>UICC-Stadium</b>	<b>III vs. IV</b>	2,837 (0,646-12,455)	0,144	2,531 (0,574-11,166)	0,199
<b>IDO1-Expression in Epithelzellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	2,830 (0,976-8,212)	0,043*	2,511 (0,869-7,260)	0,075
<b>IDO1-Expression in Immunzellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	1,509 (0,905-2,495)	0,102	1,859 (0,127-3,066)	0,009*

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

**Tabelle 20:** Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Parametern sowie der IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Weiblich vs. männlich</b>	0,428 (0,097-1,890)	0,263	0,703 (0,170-2,908)	0,627
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	2,683 (0,696-10,351)	0,152	4,978 (1,397-17,733)	0,013*
<b>UICC-Stadium</b>	<b>III vs. IV</b>	2,118 (0,476-9,428)	0,325	1,132 (0,229-5,591)	0,879
<b>IDO1-Expression in Epithelzellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	1,540 (0,454-5,224)	0,488	1,153 (0,312-4,260)	0,831
<b>IDO1-Expression in Immunzellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	1,246 (0,726-2,137)	0,425	1,951 (1,079-3,528)	0,027*

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

## **5.2 FACS-Analyse zur IDO1-Expression**

Für die Untersuchung der Makrophagenpopulationen und deren IDO1-Expression wurden Blut- und Gewebeproben durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung der Expression der verschiedenen Makrophagenmarker erfolgte prozentual. Aus allen gemessenen Werten wurde der Durchschnitt berechnet.

Wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der Student's t-Test mit Welch-Korrektur angewandt. Mithilfe der one-way ANOVA wurden mehrere Untergruppen miteinander verglichen.

### 5.2.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorkohorte

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Blutproben wurden 19 Patienten prospektiv eingeschlossen. Die Gatingstrategie ist exemplarisch an einer Patientenprobe in Abbildung 12 dargestellt.

Die Patientenkohorte setzte sich aus 10 (52,6%) Frauen und 9 (47,4%) Männern zusammen.

14 (73,7%) der Patienten waren  $\leq 75$  Jahre alt, wohingegen 5 (26,3%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumore wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert: T1: 4 (21,1%), T2: 4 (21,1%), T3: 3 (15,8%), T4: 8 (41,1%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N0: 14 (73,7%), N1: 1 (5,3%), N2a: 1 (5,3%), N2b: 2 (10,5%), N3b: 1 (5,3%).

Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf.

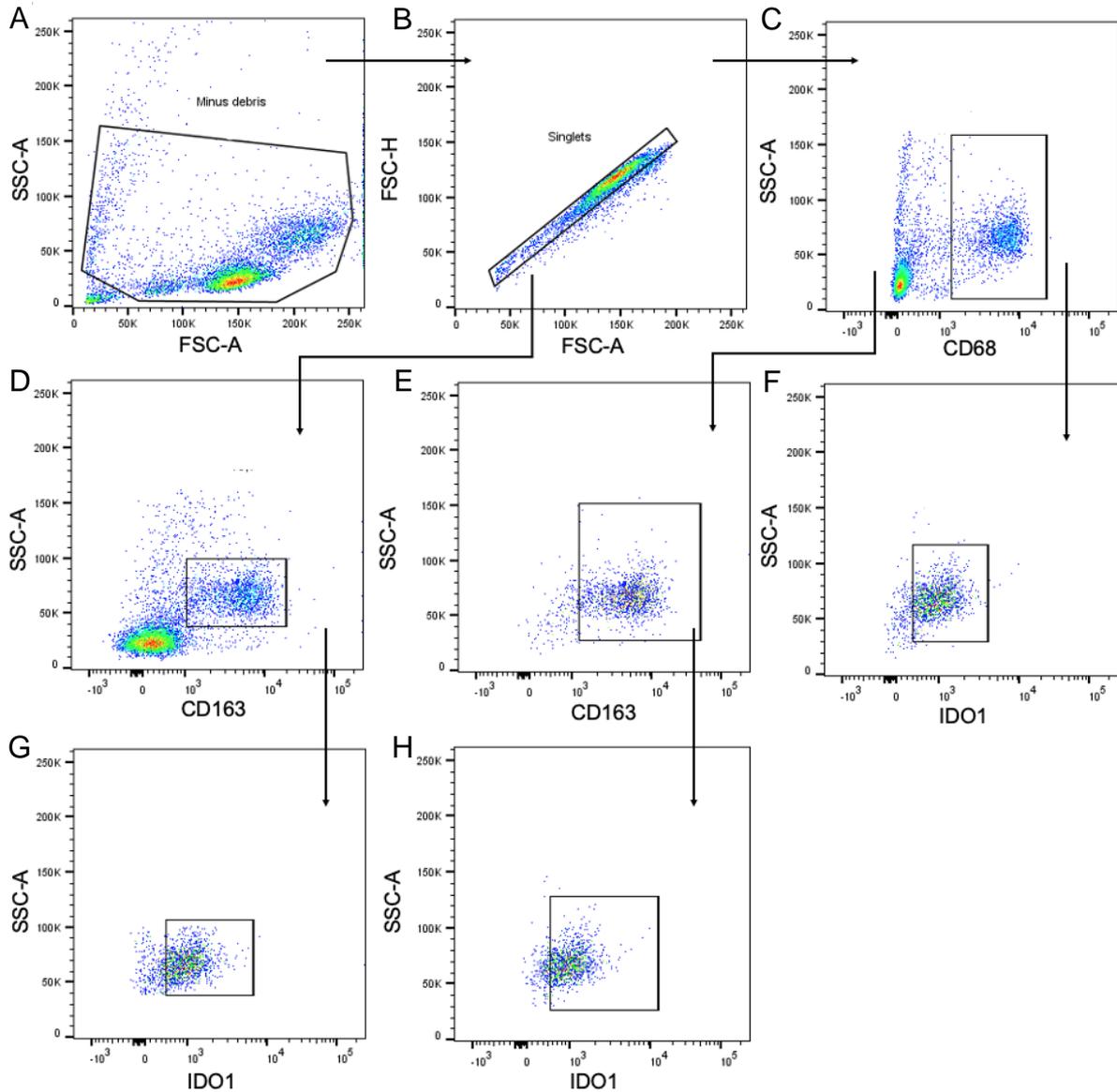
Anhand der TNM-Klassifikation wurden die Patienten in die folgenden UICC-Stadien eingeteilt: I: 4 (21,1%), II: 3 (15,8%), III: 3 (15,8%), IV: 9 (47,4%).

Die Differenzierung der Tumore wurde wie folgt beurteilt: G1: 2 (10,5%), G2: 6 (31,6%), G3: 8 (42,1%).

Die Kohorte der gesunden Kontrollpatienten setzte sich aus vier Patienten zusammen. Diese waren jeweils zur Hälfte männlich und weiblich (je zwei, 50%). 3 (75%) der Patienten waren  $\leq 75$  Jahre alt, 1 Patient (25%) war älter als 75 Jahre.

Die Zusammensetzung der Kohorte der Tumorkohorte unterschied sich hinsichtlich der Zugehörigkeit zu den Altersgruppen  $\leq 75$  und  $> 75$  Jahre (t-Test,  $p=0,987$ ) sowie dem Geschlecht (t-Test,  $p=0,522$ ) nicht signifikant von der der gesunden Kontrollpersonen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorten ist in Tabelle 21 dargestellt.



**Abbildung 12:** Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) auf die Expression von CD68, CD163 und IDO1.

(A) Zunächst erfolgte mithilfe der SSC-A- und FSC-A-Gates der Ausschluss von zellulärem Debris. (B) Zellen, die aneinander adhärten und keinen Einzelzellstrahl bildeten, wurden ausgeschlossen. Singlets zeichnen sich hierbei durch einen linearen Zusammenhang zwischen FSC-A und FSC-H aus. (C) CD68<sup>+</sup>-Zellen wurden als Makrophagen definiert. (D) CD163<sup>+</sup>-Zellen wurden als weitere Makrophagengruppe definiert. (E) Von den CD68<sup>+</sup>-Zellen wurde der CD163<sup>+</sup>-Anteil gemessen. Anschließend wurde von den (F) CD68<sup>-</sup>, (G) CD163<sup>+</sup>- und (H) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen der IDO1<sup>+</sup>-Anteil ausgewertet.

Abkürzungen: FSC-A/H = forward scatter area/height; SSC-A = side scatter area

**Tabelle 21:** Auflistung der klinischen Parameter der Patientenkohorte für die durchflusszytometrische Untersuchung der IDO1-Expression

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)	Anzahl der gesunden Kontrollpatienten (%)
<b>Geschlecht</b>		
<b>Männlich</b>	9 (47,4)	2 (50)
<b>Weiblich</b>	10 (52,6)	2 (50)
<b>Alter</b>		
<b>≤ 75 Jahre</b>	14 (73,7)	3 (75)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	5 (26,3)	1 (25)
<b>T-Klassifikation</b>		
<b>1</b>	4 (21,1)	
<b>2</b>	4 (21,1)	
<b>3</b>	3 (15,8)	
<b>4</b>	8 (41,1)	
<b>N-Klassifikation</b>		
<b>0</b>	14 (73,7)	
<b>1</b>	1 (5,3)	
<b>2a</b>	1 (5,3)	
<b>2b</b>	2 (10,5)	
<b>3b</b>	1 (5,3)	
<b>M-Klassifikation</b>		
<b>0</b>	19 (100)	
<b>1</b>	0 (0)	
<b>UICC-Stadium</b>		
<b>I</b>	4 (21,1)	
<b>II</b>	3 (15,8)	
<b>III</b>	3 (15,8)	
<b>IV</b>	9 (47,4)	
<b>Grading</b>		
<b>1</b>	2 (10,5)	
<b>2</b>	6 (31,6)	
<b>3</b>	8 (42,1)	

Abbreviation: UICC = Union internationale contre le cancer

### 5.2.2 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen der Tumor- und Kontrollpatientenkohorte

Die Expression von CD68, welches sowohl auf M1- als auch auf M2-Makrophagen exprimiert wird, CD163 und CD206 als M2-Makrophagenmarker sowie der IDO1<sup>+</sup>-Anteil der verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde in den PBMCs sowohl der Tumorpatienten als auch der gesunden Kontrollpersonen quantifiziert und verglichen.

Die Tumorpatienten in den UICC-Stadien III und IV wiesen im Allgemeinen einen höheren Anteil CD68<sup>+</sup>-Zellen auf als die Tumorpatienten in den UICC-Stadien I und II. Der Unterschied zwischen den Patienten des UICC-Stadiums IV und den Patienten der Stadien I und II war hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Zudem wiesen die Tumorpatienten in den Stadien III und IV einen hochsignifikant höheren Anteil CD68<sup>+</sup>-Zellen auf als die gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,001$ ).

Der Anteil CD163<sup>+</sup>-Zellen war bei den Patienten in den UICC-Stadien III und IV am höchsten und zudem signifikant höher als in der Kontrollkohorte ( $p < 0,05$ ).

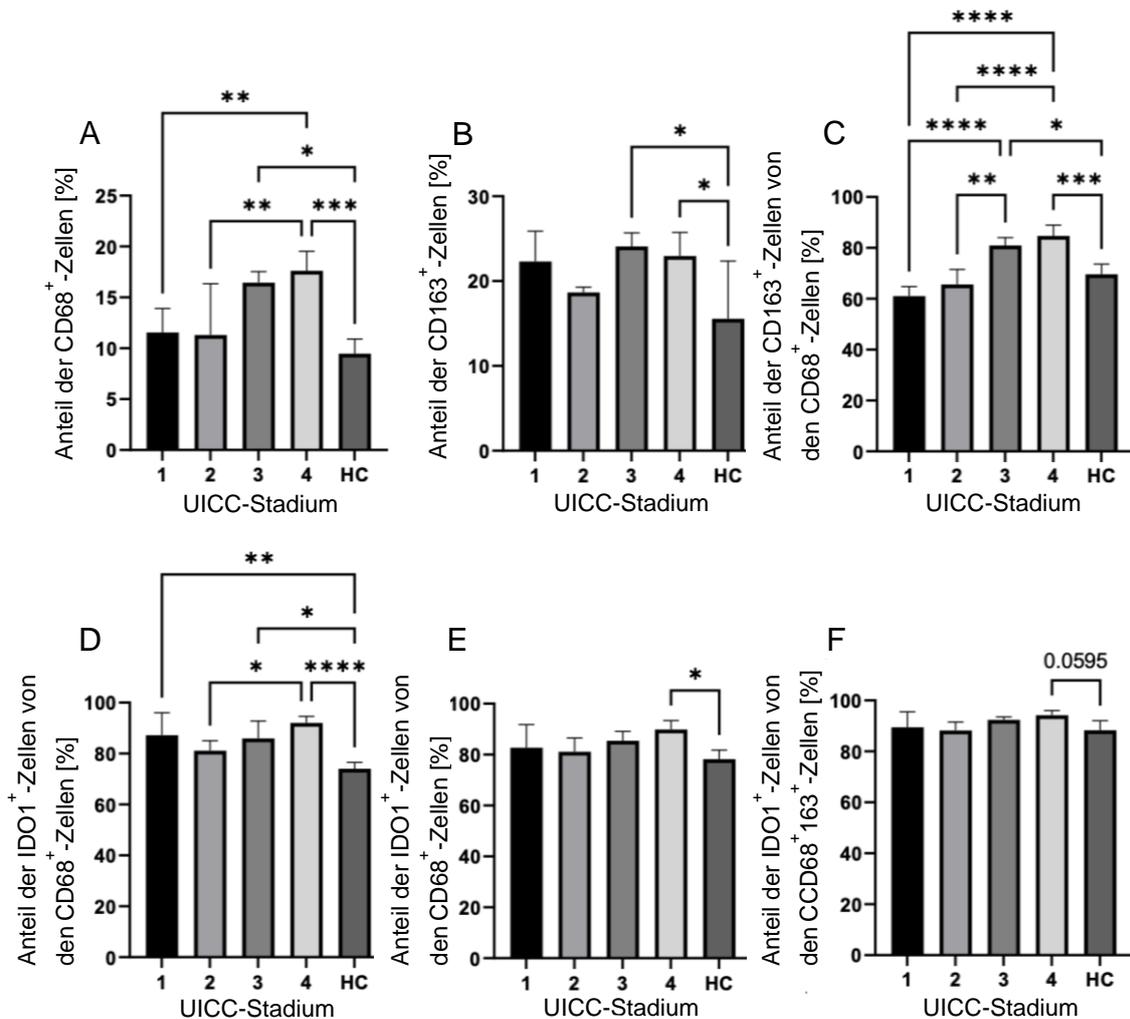
Bei der Auswertung des CD163<sup>+</sup>-Anteils der CD68<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich, dass dieser mit zunehmendem UICC-Stadium zunimmt. Der Vergleich zwischen dem UICC-Stadium I und den UICC-Stadien III und IV zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Zudem wiesen die Patienten im UICC-Stadium II einen signifikant geringeren Anteil als die Patienten in den Stadien III ( $p < 0,01$ ) und IV ( $p < 0,0001$ ) auf. Zudem war der Unterschied zwischen den Patienten in den UICC-Stadien III ( $p < 0,05$ ) und IV ( $p < 0,001$ ) und den Kontrollpatienten signifikant.

Der IDO1<sup>+</sup>-Anteil der CD68<sup>+</sup>-Zellen war bei den Patienten im UICC-Stadium IV signifikant höher als bei den Patienten im UICC-Stadium II ( $p < 0,05$ ). Zudem wiesen die Patienten in den UICC-Stadien I ( $p < 0,01$ ), III ( $p < 0,05$ ) und IV ( $p < 0,0001$ ) einen signifikant höheren IDO1<sup>+</sup>-Anteil auf als die gesunde Kontrollkohorte.

Hinsichtlich der IDO1-Expression der CD163<sup>+</sup>-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den UICC-Stadien gefunden werden. Jedoch war die IDO1-Expression in den UICC-Stadien III und IV höher als in den Stadien I und II. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war die Expression im UICC-Stadium IV jedoch signifikant höher ( $p < 0,05$ ).

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Auswertung des IDO1<sup>+</sup>-Anteils der CD68<sup>+</sup>CD168<sup>+</sup>-Zellen. Die IDO1-Expression in den UICC-Stadien III und IV war höher als in den Stadien I und II, jedoch konnte auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Unterschied zwischen der IDO1-Expression im Stadium IV und der der gesunden Kontrollkohorte war jedoch annähernd signifikant ( $p=0,0595$ ).

Die Abbildung 13 zeigt die vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen.



**Abbildung 13:** Quantifizierung und Vergleich der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zwischen den Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom, subgruppiert in die jeweils vorliegenden UICC-Stadien, und der gesunden Kontrollkohorte.

Die Grafiken zeigen den jeweiligen prozentualen Anteil der (A) CD68<sup>+</sup>- und (B) CD163<sup>+</sup>-Zellen sowie (C) den Anteil der CD163<sup>+</sup>-Zellen an den CD68<sup>+</sup>-Zellen. Ebenfalls ist der IDO1<sup>+</sup>-Anteil der (D) CD68<sup>+</sup>-, (E) CD163<sup>+</sup>- und (F) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen dargestellt.

Die prozentualen Anteile sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Asteriske markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

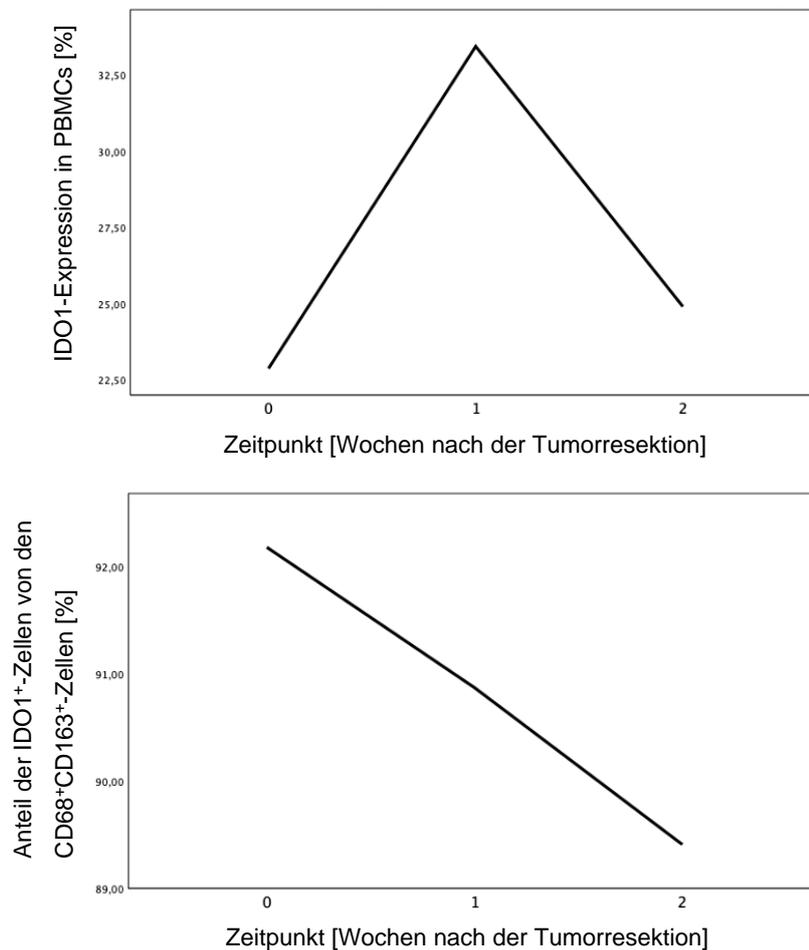
\* markiert einen p-Wert <0,05, \*\* markiert einen p-Wert <0,01, \*\*\* markiert einen p-Wert <0,001 und \*\*\*\* markiert einen p-Wert <0,0001.

### 5.2.3 Postoperativer Verlauf der IDO1-Expression

Die IDO1-Expression in der Gesamt-PBMC-Population wurde im postoperativen Verlauf über zwei Wochen untersucht. Insgesamt konnte eine Zunahme der IDO1-Expression von Tag 0 bis Tag 7 beobachtet werden. Nach dem siebten Tag hat die IDO1-Expression wiederum signifikant abgenommen ( $p=0,01$ ) und erreichte nach 14 Tagen annähernd das präoperative Niveau.

Bemerkenswert war die signifikante Abnahme der IDO1-Expression in CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der zwei Wochen post operationem (t-Test,  $p<0,05$ ).

Die IDO1-Expression im postoperativen Verlauf ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Verlauf der IDO1-Expression in der Gesamt-peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-Population und in den CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen innerhalb von zwei Wochen post operationem.

#### 5.2.4 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Analyse von Tumor und angrenzendem gesunden Normalgewebe des OSCCs hinsichtlich der Abundanz von Makrophagen und IDO1-exprimierenden Makrophagen dargestellt.

Im Allgemeinen waren mehr CD68<sup>+</sup>-, CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Makrophagen im Tumorgewebe als im angrenzenden gesunden Nachbargewebe lokalisiert.

Die CD68<sup>+</sup>-Zellen wiesen eine annähernd signifikant höhere Abundanz im Tumorgewebe als im angrenzenden Nachbargewebe auf ( $p=0,0505$ ).

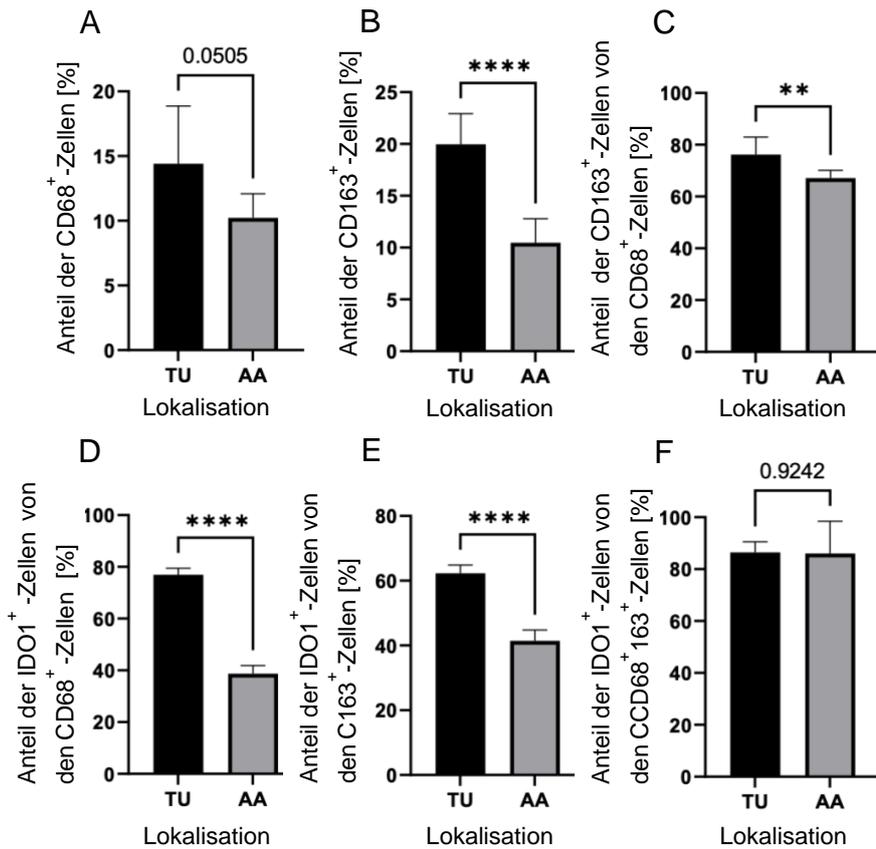
Der Anteil CD163<sup>+</sup>-Zellen war im Tumorgewebe hochsignifikant höher als im Nachbargewebe ( $p<0,0001$ ).

Ebenfalls war der Anteil CD163<sup>+</sup>-Zellen an den CD68<sup>+</sup>-Zellen im Tumorgewebe hochsignifikant höher als im Nachbargewebe ( $p<0,01$ ).

Der Anteil IDO1<sup>+</sup>-Zellen an den CD68<sup>+</sup>- und CD163<sup>+</sup>-Zellen war hochsignifikant höher als im Nachbargewebe ( $p<0,0001$ ).

Im Gegensatz dazu konnte ein vergleichbarer IDO1<sup>+</sup>-Anteil der CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen zwischen Tumor- und Nachbargewebe festgestellt werden ( $p=0,924$ ).

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Quantifizierung und Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor (TU)- und gesundem Nachbargewebe (adjacent area, AA).

Die Grafiken zeigen den jeweiligen prozentualen Anteil der (A) CD68<sup>+</sup>- und (B) CD163<sup>+</sup>-Zellen sowie (C) den Anteil der CD163<sup>+</sup>-Zellen an den CD68<sup>+</sup>-Zellen. Ebenfalls ist der IDO1<sup>+</sup>-Anteil der (D) CD68<sup>+</sup>-, (E) CD163<sup>+</sup>- und (F) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen dargestellt.

Die prozentualen Anteile sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Asteriske markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

\*\* markiert einen p-Wert <0,01 und \*\*\*\* markiert einen p-Wert <0,0001.

### **5.3 ELISAs der Kynurenin- und Tryptophankonzentration**

Serumproben von Tumor- und gesunden Kontrollpatienten wurden mithilfe von ELISAs auf ihre Trp- und Kyn-Konzentrationen untersucht. Zudem wurde die Kyn/Trp-Ratio berechnet, da diese als Surrogat für die IDO1-Aktivität gilt. Die Serumproben wurden zum Zeitpunkt der Tumorresektion mit Neck Dissection sowie eine und zwei Wochen post operationem abgenommen.

Aus allen ermittelten Werten wurde der Durchschnitt gebildet.

Die Patientenkohorte entsprach der, deren Blutproben durchflusszytometrisch ausgewertet wurden. Die Patientencharakteristika sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der Student's t-Test mit Welch-Korrektur angewandt. Mithilfe der one-way ANOVA wurden mehrere Untergruppen miteinander verglichen.

### 5.3.1 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie deren Ratio im Serum

Es war ein Anstieg der Kyn-Konzentration und der Kyn/Trp-Ratio im Serum mit zunehmender T-Klassifikation zu beobachten. Die Kyn/Trp-Ratio war in der Patientengruppe mit T4-Tumor annähernd signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,058$ ).

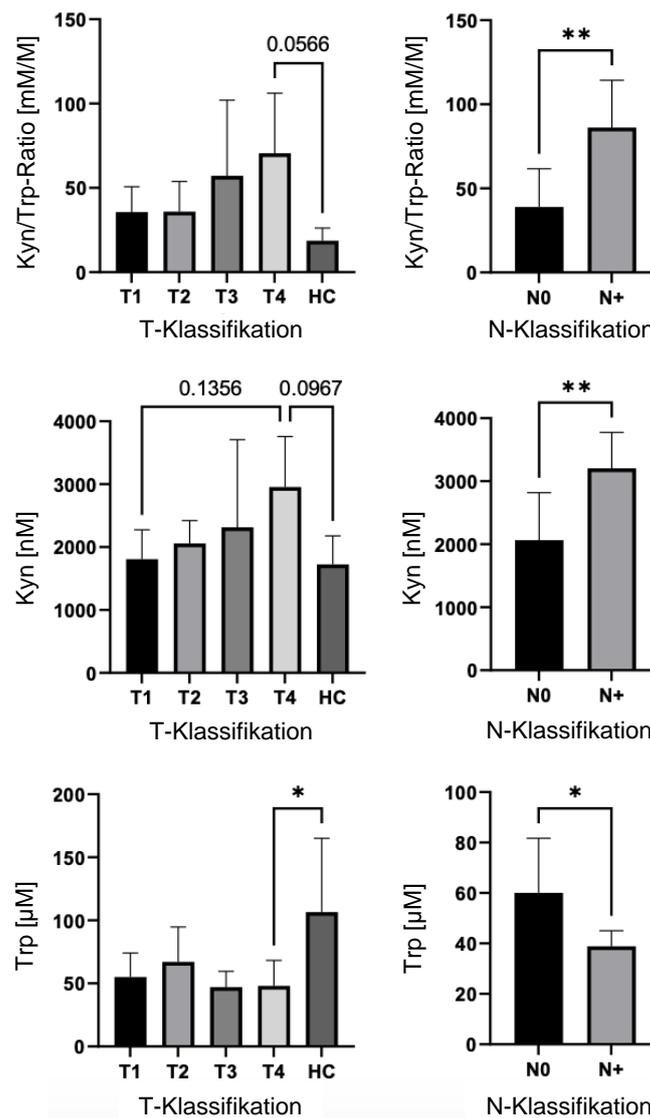
Ein ähnliches Ergebnis konnte hinsichtlich der Kyn-Konzentration beobachtet werden. In der Patientengruppe mit T4-Tumor war die Kyn-Konzentration annähernd signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,067$ ).

Die Trp-Konzentration war bei den Tumorpatienten mit T1- und T2-Tumoren höher als bei Tumorpatienten mit T3- und T4-Tumoren. Hinsichtlich der Trp-Konzentration konnte zwischen den Tumorpatienten mit einem T4-Tumor und der gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied beobachtet werden ( $p<0,05$ ).

Dass keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen mit unterschiedlich großen Tumoren vorlagen, kann, zumindest zum Teil, auf die großen interindividuellen Schwankungen der Konzentrationen zurückgeführt werden.

Bemerkenswert war, dass sich die Kyn/Trp-Ratio, die Kyn-Konzentration sowie die Trp-Konzentration signifikant zwischen Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen unterschieden haben ( $p<0,05$ ).

Die Trp- und Kyn-Konzentrationen sowie deren Ratio sind in Abbildung 16 zum Zeitpunkt der primären Tumorresektion in Abhängigkeit von der T- und N-Klassifikation dargestellt.



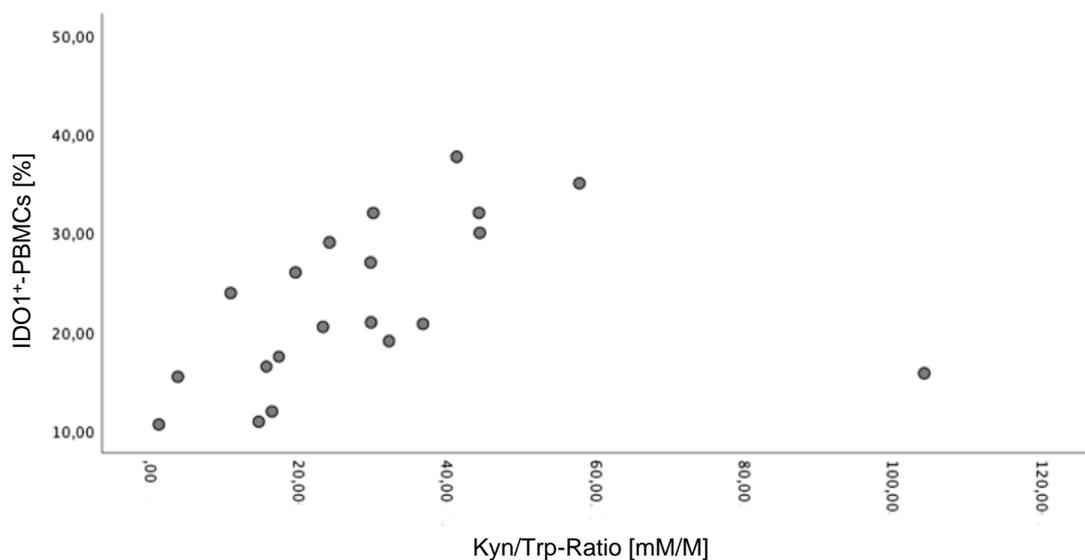
**Abbildung 16:** Serumkonzentrationen von Kynurenin (Kyn) und Tryptophan (Trp) sowie deren Ratio zum Zeitpunkt der primären Tumorresektion in Abhängigkeit von der T- und N-Klassifikation.

Die prozentualen Anteile sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Asteriske markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. \* markiert einen p-Wert  $<0,05$  und \*\* markiert einen p-Wert  $<0,01$ .

### 5.3.2 Korrelation der Kynurenin/Tryptophan-Ratio mit der IDO1-Expression in PBMCs und Epithelzellen

Die Kyn/Trp-Ratio wurde auf eine Korrelation mit der IDO1-Expression in PBMCs und epithelialen Tumorzellen des OSCCs untersucht. Die Kyn/Trp-Ratio korrelierte mit der IDO1-Expression der PBMCs ( $p < 0,05$ ). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kyn/Trp-Ratio und der IDO1-Expression in den epithelialen Tumorzellen beobachtet werden ( $p = 0,672$ ).

Die Korrelationsanalyse ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17:** Korrelation der Kynurenin/Tryptophan-Ratio (Kyn/Trp-Ratio) im Serum mit der IDO1-Expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

### 5.3.3 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie ihre Ratio im postoperativen Verlauf

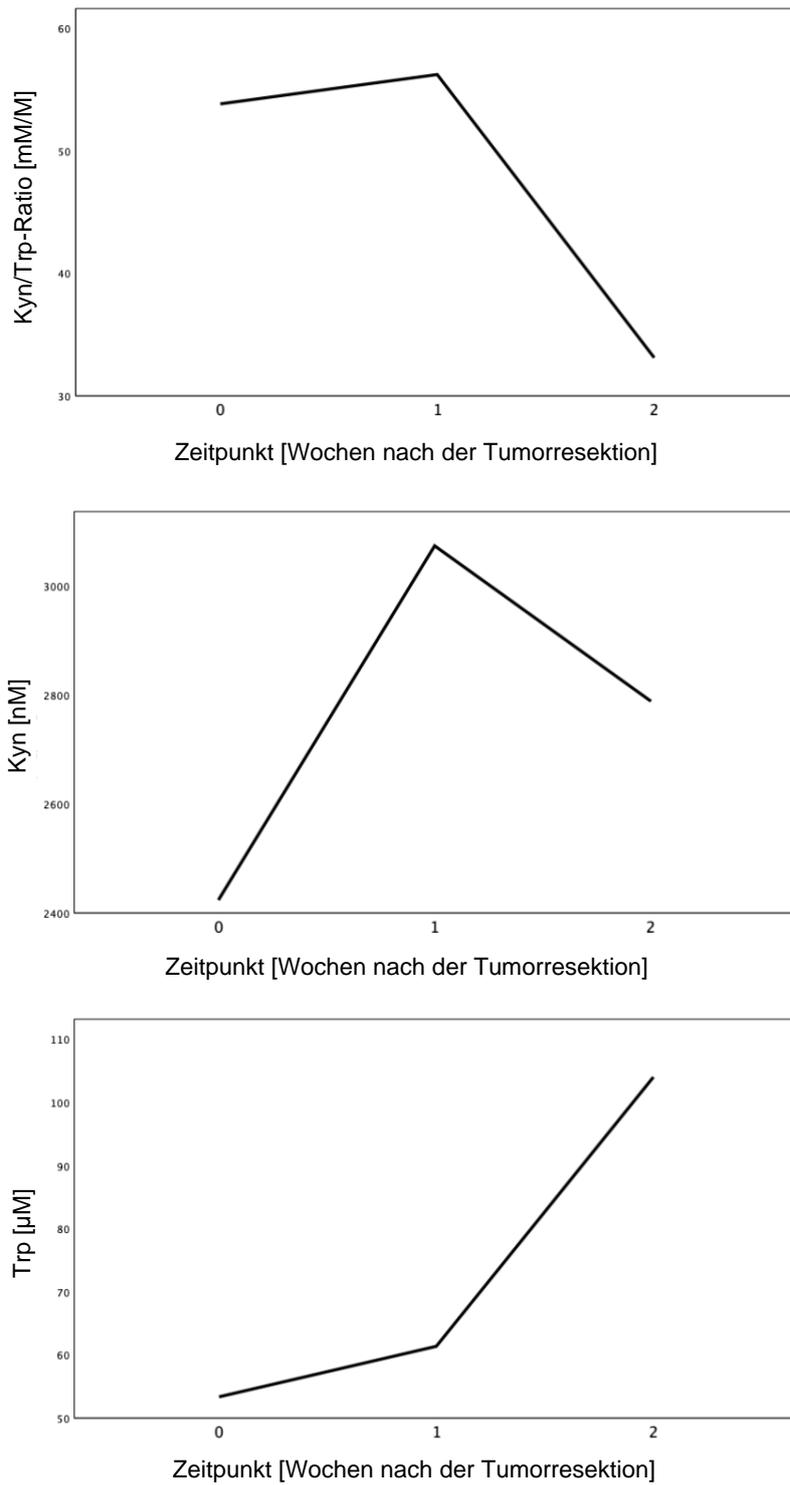
Die Serumkonzentrationen von Kyn und Trp sowie deren Ratio wurden im postoperativen Verlauf über zwei Wochen untersucht.

Es konnte eine Zunahme der Kyn-Konzentration in der ersten Woche festgestellt werden. In der zweiten Woche war hingegen eine Abnahme zu verzeichnen ( $p > 0,05$ ). Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Kyn-Konzentration zwischen Tag 0 und Tag 14 festgestellt werden ( $p = 0,385$ ).

Im Gegensatz dazu ist die Trp-Konzentration im postoperativen Verlauf von Tag 0 zu Tag 7 zunächst leicht und von Tag 7 zu Tag 14 stärker gestiegen. Der Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 14 war signifikant ( $p = 0,042$ ).

Insgesamt hat die Kyn/Trp-Ratio im postoperativen Verlauf abgenommen. Der Unterschied zwischen dem Zeitpunkt der Tumorresektion und zwei Wochen post operationem war jedoch nur annähernd signifikant ( $p = 0,067$ ). Dies führten wir auf die großen interindividuellen Schwankungen der Konzentrationen zurück.

Die Kyn- und Trp-Konzentrationen sowie die Kyn/Trp-Ratio im postoperativen Verlauf sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Verlauf der Serumkonzentrationen von Kynurenin (Kyn), Tryptophan (Trp) und ihrer Ratio (Kyn/Trp-Ratio) innerhalb von zwei Wochen post operationem.

#### **5.4 Immunhistochemische Untersuchungen zur TREM2-Expression**

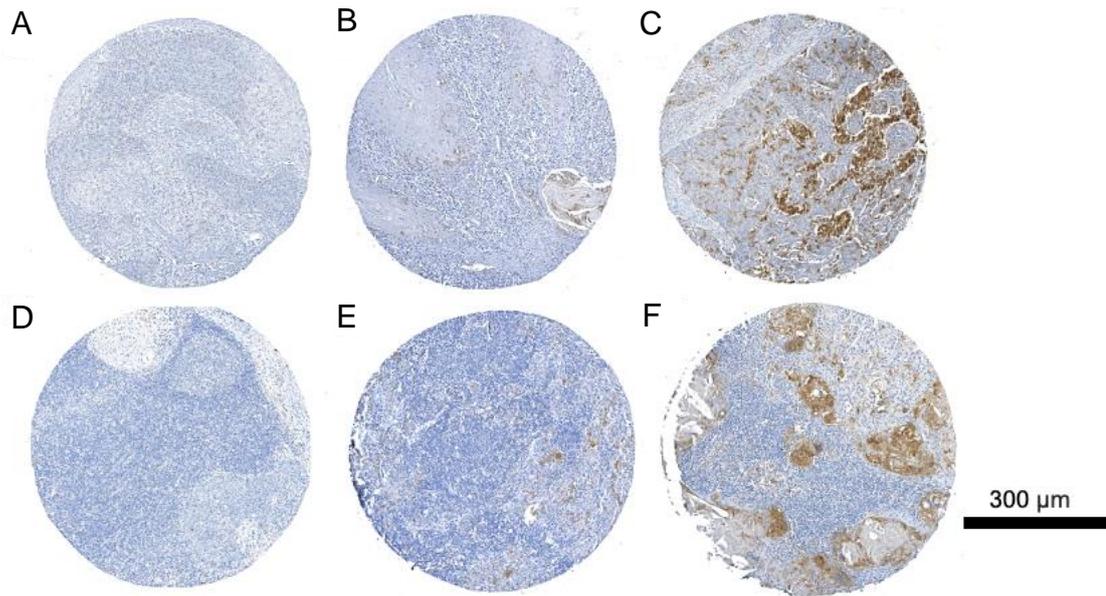
Im Rahmen der Untersuchung der TREM2-Expression auf Immunzellen in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des OSCCs wurden TMAs immunhistochemisch gefärbt. Daraufhin wurde die Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen ermittelt und die Patientenkohorte in Patienten mit hoher und niedriger TREM2-Expression klassifiziert. Die Abbildung 19 zeigte exemplarisch unterschiedlich hohe TREM2-Expressionen in Immunzellen von Primärtumoren sowie Lymphknotenmetastasen.

Die Färbungen zur PD-L1- und PD-L2-Expression im gleichen Patientenkollektiv wurden in einer vorherigen Arbeit durchgeführt (Moratin et al., 2019). Die p16-Färbung sowie die In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von HPV-DNA wurden nach bereits veröffentlichten Protokollen vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes angefertigt (Kühn et al., 2021; Linxweiler et al., 2015).

Zur Ermittlung von Korrelationen zwischen der TREM2-Expression und klinisch-histopathologischer Charakteristika wurde der SRC berechnet.

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses der TREM2-Expression auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben erfolgte die Darstellung von Überlebenskurven nach Kaplan-Meier differenziert nach der TREM2-Expression sowie die Auswertung mittels Log-Rank-Tests.

Zur Überprüfung der prognostischen Relevanz der TREM2-Expression sowie klinischer und weiterer histopathologischer Marker in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben erfolgten uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen mit Berechnung der HR und der 95%CI.



**Abbildung 19:** Exemplarische Darstellung einer (A) niedrigen, (B) mittleren und (C) hohen TREM2-Expression auf Immunzellen der Primärtumoren sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen (D-E).

Der schwarze Balken repräsentiert 300  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.1 TREM2-Expression in Primärtumoren

##### *5.4.1.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorkohorte*

Insgesamt wurden die Primärtumoren von 171 Patienten retrospektiv auf die Abundanz von TREM2-exprimierenden Immunzellen untersucht.

Die Patientenkohorte setzte sich aus 71 (41,5%) Frauen und 100 (58,5%) Männern zusammen.

135 (78,9%) der Patienten waren  $\leq 75$  Jahre alt, wohingegen 36 (21,1%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumore wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert: T1: 59 (34,5%), T2: 58 (33,9%), T3: 7 (4,1%), T4: 47 (27,5%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N0: 119 (69,6%), N1: 19 (11,1%), N2b: 19 (11,1%), N2c: 14 (8,2%).

Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf.

Anhand der TNM-Klassifikation wurden die Patienten in die folgenden UICC-Stadien eingeteilt: UICC-Stadium I: 52 (30,4%), II: 38 (22,2%), III: 18 (10,5%), IV: 63 (36,8%).

Die Differenzierung der Tumoren wurde wie folgt beurteilt: G1: 15 (8,8%), G2: 117 (68,4%), G3: 37 (21,6%).

47 (26,9%) der Tumoren waren im Bereich des Mundbodens, 43 (24,6%) im Bereich der Zunge, 55 (31,4%) im Bereich des Unterkiefers, 3 (1,7%) im Bereich des Oberkiefers, 11 (6,3%) im Bereich des Weichgaumens und 12 (6,9%) im Bereich des Planum buccale lokalisiert.

Bei 33 (19,3%) der Patienten ist nach der primären Tumorresektion und Neck Dissection sowie der im Falle von Risikofaktoren nach Leitlinie durchgeführten adjuvanten Therapie ein Rezidiv aufgetreten. Im Gegensatz dazu waren 138 (80,7%) der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung rezidivfrei.

54 (31,6%) wiesen eine hohe p16-Expression auf, wohingegen 90 (52,6%) der Tumoren p16-negativ waren.

In keinem der Tumore ließ sich HPV-DNA nachweisen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorte ist in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22:** Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften der Patientenkohorte

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)
<b>Geschlecht</b>	
<b>Männlich</b>	100 (58,5)
<b>Weiblich</b>	71 (41,5)
<b>Alter</b>	
<b>≤ 75 Jahre</b>	135 (78,9)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	36 (21,1)
<b>T-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	59 (34,5)
<b>2</b>	58 (33,9)
<b>3</b>	7 (4,1)
<b>4</b>	47 (27,5)
<b>N-Klassifikation</b>	
<b>0</b>	119 (69,6)
<b>1</b>	19 (11,1)
<b>2b</b>	19 (11,1)
<b>2c</b>	14 (8,2)
<b>UICC-Stadium</b>	
<b>I</b>	52 (30,4)
<b>II</b>	38 (22,2)
<b>III</b>	18 (10,5)
<b>IV</b>	63 (36,8)
<b>Grading</b>	
<b>1</b>	15 (8,8)
<b>2</b>	117 (68,4)
<b>3</b>	37 (21,6)
<b>Fehlend</b>	2 (1,2)
<b>Lokalisation</b>	
<b>Mundboden</b>	47 (26,9)
<b>Zunge</b>	43 (24,6)
<b>Unterkiefer</b>	55 (31,4)
<b>Oberkiefer</b>	3 (1,7)
<b>Weichgaumen</b>	11 (6,3)
<b>Planum buccale</b>	12 (6,9)
<b>Fehlend</b>	2 (1,1)
<b>Rezidiv</b>	
<b>Ja</b>	33 (19,3)
<b>Nein</b>	138 (80,7)
<b>p16</b>	
<b>Positiv</b>	54 (31,6)
<b>Negativ</b>	90 (52,6)
<b>Fehlend</b>	27 (15,8)
<b>HPV-DNA</b>	
<b>Negativ</b>	144 (84,3)
<b>Fehlend</b>	27 (15,7)

Abkürzungen: DNA = desoxyribonucleinacid; HPV = Humane Papillomaviren; UICC = Union internationale contre le cancer

#### *5.4.1.2 Korrelation der TREM2-Expression in Immunzellen mit klinischen und histopathologischen Parametern*

Die TREM2-Expression in Immunzellen wurde auf eine potentielle Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern untersucht.

Das weibliche Geschlecht korrelierte mit einer höheren TREM2-Expression ( $p=0,021$ ).

Zudem war ein höheres Alter ( $> 75$  Jahre) mit einer höheren TREM2-Expression assoziiert. Die Korrelation verfehlte jedoch das Signifikanzniveau ( $p=0,097$ ).

Tumore, welche histopathologisch einer höheren T-Klassifikation zugeordnet wurden, wiesen durchschnittlich auch eine höhere Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen auf ( $p=0,030$ ). Ebenfalls wiesen Tumoren, die bereits in die lokoregionären Lymphknoten metastasiert hatten, eine höhere Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen auf. Die Korrelation verfehlte hierbei das Signifikanzniveau knapp ( $p=0,050$ ).

Insgesamt konnte jedoch eine positive, signifikante Korrelation zwischen den UICC-Stadien und der TREM2-Expression beobachtet werden ( $p=0,040$ ).

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading der Primärtumoren und der TREM2-Expression in Immunzellen festgestellt werden ( $p=0,102$ ).

Die Lokalisation des Tumors im Bereich des Unterkiefers sowie im Bereich des Weichgaumens zeigte eine signifikante Korrelation mit einer höheren Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen ( $p=0,023$ ).

Die Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen schien in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs zu stehen ( $p=0,116$ ).

Eine hohe TREM2-Expression im Primärtumor zeigte eine hochsignifikante Korrelation mit der PD-L1- ( $p<0,001$ ) sowie annähernd signifikante Korrelation mit der PD-L2-Expression ( $p=0,088$ ).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der p16-Expression und der TREM2-Expression beobachtet werden ( $p=0,700$ ).

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23:** Korrelation der klinischen Parameter mit der TREM2-Expression in Immunzellen der Primärtumore

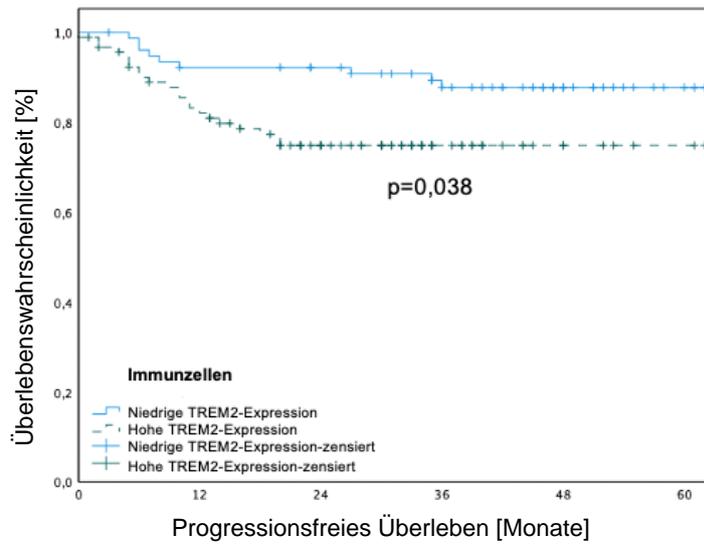
Charakteristika		Niedrige TREM2-Expression (%)	Hohe TREM2-Expression (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	53 (53)	47 (47)	0,021*
	Weiblich	25 (35,2)	46 (64,8)	
Alter	≤ 75 Jahre	66 (48,9)	69 (51,1)	0,097
	> 75 Jahre	12 (33,3)	24 (66,7)	
T-Klassifikation	1	32 (54,2)	27 (45,8)	0,030*
	2	28 (48,3)	30 (51,7)	
	3	2 (28,6)	5 (71,4)	
	4	16 (34)	31 (66)	
N-Klassifikation	0	60 (50,4)	59 (49,6)	0,050
	1	8 (42,1)	11 (57,9)	
	2b	5 (26,3)	14 (73,7)	
	2c	5 (35,7)	9 (64,3)	
UICC-Stadium	I	28 (53,8)	24 (46,2)	0,040*
	II	19 (50)	19 (50)	
	III	9 (50)	9 (50)	
	IV	22 (34,9)	41 (65,1)	
Grading	1	13 (86,7)	2 (13,3)	0,102
	2	48 (41)	69 (59)	
	3	15 (44,1)	19 (55,9)	
	Fehlend	2 (40)	3 (60)	
Lokalisation	Mundboden	26 (55,3)	21 (44,7)	0,023*
	Zunge	23 (54,7)	19 (45,3)	
	Unterkiefer	20 (38,5)	32 (61,5)	
	Oberkiefer	1 (33,3)	2 (66,7)	
	Unterlippe	0 (0)	1 (100)	
	Weichgaumen	2 (18,2)	9 (81,8)	
	Planum buccale	6 (50)	6 (50)	
	Fehlend	0 (0)	3 (100)	
Rezidiv	Nein	67 (48,5)	71 (51,5)	0,116
	Ja	11 (33,3)	22 (66,7)	
PD-L1	Negativ	33 (73,3)	12 (26,7)	<0,001*
	Positiv	36 (33,3)	69 (63,9)	
	Fehlend	9 (34,3)	12 (65,7)	
PD-L2	Negativ	15 (62,5)	9 (37,5)	0,088
	Positiv	53 (43,4)	69 (56,6)	
	Fehlend	10 (40)	15 (60)	
p16	Negativ	43 (47,7)	47 (52,3)	0,700
	Positiv	24 (44,4)	30 (55,6)	
	Fehlend	11 (40,7)	16 (59,3)	

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: PD-L1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

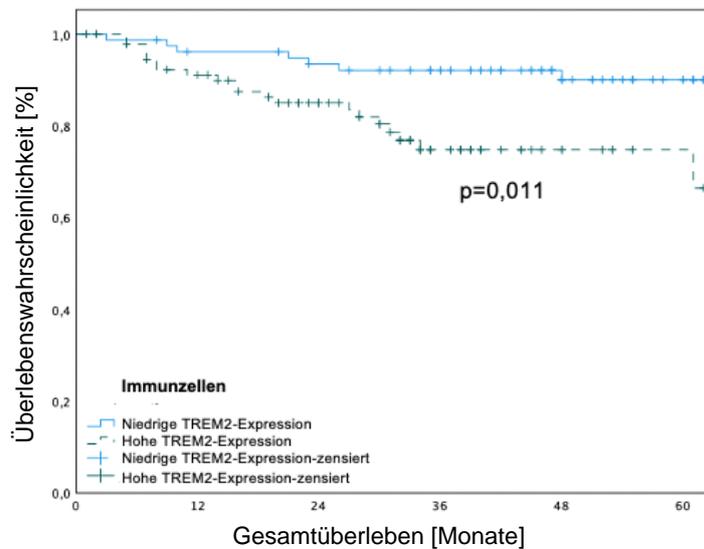
#### *5.4.1.3 Einfluss der TREM2-Expression auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben*

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abbildung 20 zeigen, dass Patienten mit einer hohen TREM2-Expression ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben aufwiesen ( $p=0,038$ ). Zudem überlebten Patienten, deren Primärtumoren eine hohe TREM2-Expression zeigten, signifikant kürzer ( $p=0,011$ ).



Anzahl:  
Niedrige TREM2-  
Expression  
Hohe TREM2-  
Expression

	78	70	67	58	40	27
	93	73	53	25	13	8



Anzahl:  
Niedrige TREM2-  
Expression  
Hohe TREM2-  
Expression

	78	73	69	62	45	30
	93	80	62	29	14	9

**Abbildung 20:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der TREM2-Expression in Immunzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven.

Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten

#### *5.4.1.4 Uni- und Multivariatanalyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens*

Die univariate Analyse zeigte einen signifikanten Einfluss der TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 2.126; 95%CI: 1.023-4.418; p=0,038) sowie des UICC-Stadiums (HR: 2.826; 95%CI: 1.135-5.916; p=0,004) auf das progressionsfreie Überleben.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens wurden die TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 2.816; 95%CI: 1.224-6.478; p=0,011) sowie das UICC-Stadium (HR: 2.929; 95%CI: 1.316-6.516; p=0,006) ebenfalls als signifikante Einflussfaktoren identifiziert.

In der Multivariat-Analyse wurden die TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 2.17; 95%CI: 1.021-4.613; p=0,044) sowie das UICC-Stadium (HR: 2.876; 95%CI: 1.367-6.05; p=0,005) als signifikante, unabhängige Einflussfaktoren des progressionsfreien Überlebens bestätigt. Die TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 2.548; 95%CI: 1.089-5.964; p=0,031) sowie das UICC-Stadium (HR: 2.885; 95%CI: 1.282-6.493; p=0,010) wurden ebenfalls als unabhängige, signifikante Einflussfaktoren bezüglich des Gesamtüberlebens validiert.

Die Ergebnisse der uni- und multivariaten Analyse sind in den Tabellen 24 und 25 dargestellt.

**Tabelle 24:** Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Primärtumoren

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Männlich vs. Weiblich</b>	1,16 (0,548-2,453)	0,698	0,809 (0,398-1,646)	0,557
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	1,487 (0,627-3,526)	0,364	1,112 (0,482-2,569)	0,802
<b>UICC-Stadium</b>	<b>I/II vs. III/IV</b>	2,929 (1,316-6,516)	0,006*	2,826 (1,135-5,916)	0,004*
<b>TREM2-Immunezellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	2,816 (1,224-6,478)	0,011*	2,126 (1,023-4,418)	0,038*

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

**Tabelle 25:** Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Primärtumoren

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Männlich vs. weiblich</b>	1,002 (0,467-2,152)	0,996	0,618 (0,298-1,28)	0,195
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	1,328 (0,55-3,21)	0,528	1,027 (0,438-2,405)	0,951
<b>UICC-Stadium</b>	<b>I/II vs. III/IV</b>	2,885 (1,282-6,493)	0,010*	2,876 (1,367-6,05)	0,005*
<b>TREM2-Immunezellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	2,548 (1,089-5,964)	0,031*	2,17 (1,021-4,613)	0,044*

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

## 5.4.2 TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen

### 5.4.2.1 *Klinische und histopathologische Eigenschaften der nodal-positiven Patientenkohorte*

Insgesamt wurden die Lymphknotenmetastasen von 33 Patienten retrospektiv auf das Vorliegen von TREM2-exprimierenden Immunzellen sowie deren Abundanz untersucht. Die Patientenkohorte setzte sich aus 8 (24,2%) Frauen und 25 (75,8%) Männern zusammen.

27 (81,8%) der Patienten waren  $\leq$  75 Jahre alt, wohingegen 6 (18,2%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumoren wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert: T1: 5 (15,2%), T2: 11 (33,3%), T3: 4 (12,1%), T4: 13 (39,4%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N1: 12 (36%), N2b: 15 (45,5%), N2c: 6 (18,2%).

Bei keinem der Patienten lagen zum Zeitpunkt der Datenerhebung Fernmetastasen vor. Anhand der TNM-Klassifikation wurden 8 (24,2%) der Patienten in das UICC-Stadium III und 25 (75,8%) der Patienten in das UICC-Stadium IV eingeteilt.

Die Differenzierung der Tumore wurde wie folgt beurteilt: G2: 25 (75,8%), G3: 7 (21,2%). 5 (15,2%) der Tumore waren im Bereich des Mundbodens, 11 (33,3%) im Bereich der Zunge, 10 (30,3%) im Bereich des Unterkiefers, 2 (6,1%) im Bereich des Weichgaumens und 4 (12,1%) im Bereich des Planum buccale lokalisiert.

Bei 11 (33,3%) der Patienten ist nach der primären Tumorsektion und Neck Dissection sowie der im Falle von Risikofaktoren nach Leitlinie durchgeführten adjuvanten Therapie ein Rezidiv aufgetreten. Im Gegensatz dazu waren 22 (66,7%) der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung rezidivfrei.

10 (30,3%) wiesen eine hohe p16-Expression auf, wohingegen 9 (27,3%) der Tumoren p16-negativ waren.

In keinem der Tumore ließ sich HPV-DNA nachweisen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorte ist in Tabelle 26 dargestellt.

**Tabelle 26:** Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften der Patientenkohorte mit Lymphknotenmetastasen

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)
<b>Geschlecht</b>	
<b>Männlich</b>	25 (75,8)
<b>Weiblich</b>	8 (24,2)
<b>Alter</b>	
<b>≤ 75 Jahre</b>	27 (81,8)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	6 (18,2)
<b>T-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	5 (15,2)
<b>2</b>	11 (33,3)
<b>3</b>	4 (12,1)
<b>4</b>	13 (39,4)
<b>N-Klassifikation</b>	
<b>1</b>	12 (36)
<b>2b</b>	15 (45,5)
<b>2c</b>	6 (18,2)
<b>UICC-Stadium</b>	
<b>III</b>	8 (24,2)
<b>IV</b>	25 (75,8)
<b>Grading</b>	
<b>2</b>	25 (75,8)
<b>3</b>	7 (21,2)
<b>Fehlend</b>	1 (3)
<b>Lokalisation</b>	
<b>Mundboden</b>	5 (15,2)
<b>Zunge</b>	11 (33,3)
<b>Unterkiefer</b>	10 (30,3)
<b>Weichgaumen</b>	2 (6,1)
<b>Planum buccale</b>	4 (12,1)
<b>Fehlend</b>	1 (3)
<b>Rezidiv</b>	
<b>Ja</b>	11 (33,3)
<b>Nein</b>	22 (66,7)
<b>p16</b>	
<b>Negativ</b>	10 (30,3)
<b>Positiv</b>	9 (27,3)
<b>Fehlend</b>	14 (42,4)
<b>HPV-DNA</b>	
<b>Negativ</b>	19 (57,5)
<b>Fehlend</b>	14 (42,4)

Abkürzungen: DNA = desoxyribonucleinacid; HPV = Humane Papillomaviren; UICC = Union internationale contre le cancer

#### 5.4.2.2 Korrelation von der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen mit klinischen und histopathologischen Parametern

Die Auswertung des Zusammenhangs der klinischen und histopathologischen Daten mit der TREM2-Expression in Immunzellen zeigte eine signifikante Korrelation des männlichen Geschlechts mit einer höheren TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen ( $p=0,008$ ).

Ebenfalls konnte eine positive Korrelation zwischen dem Alter  $> 75$  Jahre und der TREM2-Expression beobachtet werden ( $p=0,042$ ).

Tumore zunehmender Größe wiesen im Allgemeinen auch eine höhere Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen in den Lymphknotenmetastasen auf. Die Korrelation war hierbei jedoch nur annähernd signifikant ( $p=0,054$ ).

Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und der TREM2-Expression in den Lymphknotenmetastasen gefunden werden ( $p=0,465$ ).

Patienten im UICC-Stadium IV wiesen eine höhere Anzahl von TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen in den Lymphknotenmetastasen auf als Patienten im UICC-Stadium III. Die Korrelation verfehlte hierbei jedoch das Signifikanzniveau ( $p=0,082$ ).

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Grading des Primärtumors ( $p=0,750$ ) sowie dessen Lokalisation ( $p=0,500$ ) und der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen beobachtet werden.

Es zeigte sich zudem keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl TREM2-exprimierender Immunzellen und dem Auftreten eines Rezidivs ( $p=0,386$ ).

Die TREM2-Expression korrelierte signifikant mit der PD-L1-Expression in Lymphknotenmetastasen ( $p=0,022$ ).

Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der PD-L2- ( $p=0,130$ ) sowie p16-Expression ( $p=0,434$ ) und der TREM2-Expression in den Lymphknotenmetastasen gefunden werden.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27:** Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen

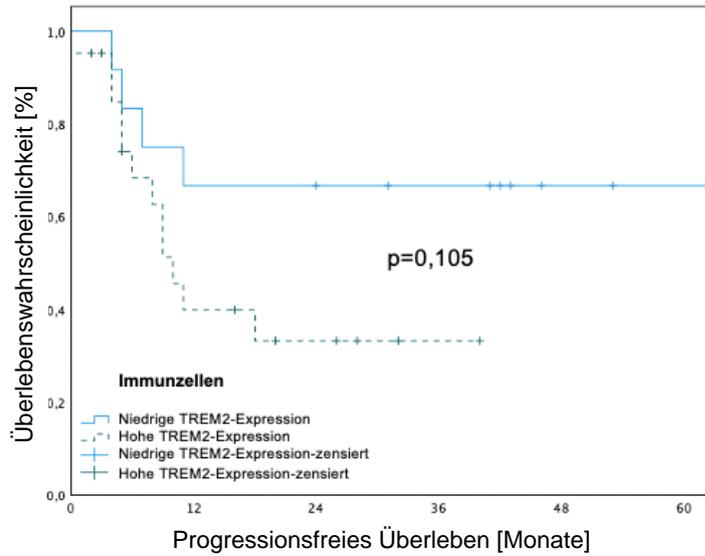
Charakteristika		Niedrige TREM2-Expression (%)	Hohe TREM2-Expression (%)	p-Wert
Geschlecht	Männlich	6 (24)	19 (76)	0,008*
	Weiblich	6 (75)	2 (25)	
Alter	≤ 75 Jahre	12 (44,4)	15 (55,6)	0,042*
	> 75 Jahre	0 (0)	6 (100)	
T-Klassifikation	1	4 (80)	1 (20)	0,054
	2	4 (36,4)	7 (63,6)	
	3	1 (25)	3 (75)	
	4	3 (23,1)	10 (76,9)	
N-Klassifikation	1	5 (45,5)	6 (54,5)	0,465
	2b	6 (40)	9 (60)	
	2c	1 (14,3)	6 (85,7)	
UICC-Stadium	III	5 (62,5)	3 (37,5)	0,082
	IV	7 (28)	18 (72)	
Rezidiv	Nein	9 (40,9)	13 (59,1)	0,386
	Ja	3 (27,3)	8 (72,7)	
Grading	2	9 (36)	16 (64)	0,750
	3	3 (42,9)	4 (57,1)	
	Fehlend	0 (0)	1 (100)	
Lokalisation	Mundboden	1 (20)	4 (80)	0,500
	Zunge	7 (63,6)	4 (36,4)	
	Unterkiefer	2 (20)	8 (80)	
	Weichgaumen	1 (50)	1 (50)	
	Planum buccale	1 (25)	3 (75)	
	Fehlend	0 (0)	1 (100)	
PD-L1	Negativ	2 (100)	0 (0)	0,022*
	Positiv	4 (22,2)	14 (77,8)	
	Fehlend	6 (46,2)	7 (53,8)	
PD-L2	Negativ	1 (100)	0 (0)	0,130
	Positiv	5 (26,3)	14 (73,7)	
	Fehlend	6 (46,2)	7 (53,8)	
p16	Negativ	4 (40)	6 (60)	0,434
	Positiv	2 (22,2)	7 (77,8)	
	Fehlend	6 (42,9)	8 (57,1)	

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

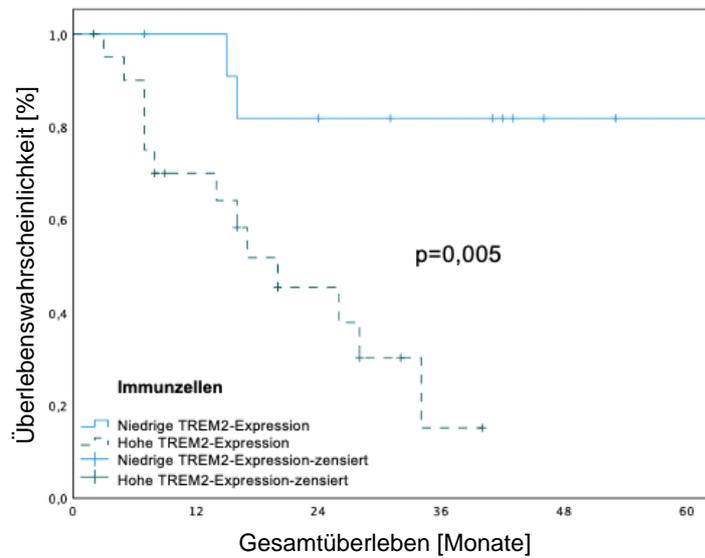
Abkürzungen: PD-L 1/2: programmed death ligand 1/2; UICC = Union internationale contre le cancer

#### *5.4.2.3 Einfluss der TREM2-Expression auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben der nodal-positiven Patientenkohorte*

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abbildung 21 zeigen, dass Patienten mit einer hohen TREM2-Expression der Immunzellen in den Lymphknotenmetastasen ein kürzeres progressionsfreies Überleben aufwiesen. Der Unterschied zwischen den Patienten mit einer hohen und denen mit einer niedrigen TREM2-Expression war jedoch nicht signifikant ( $p=0,105$ ). Patienten mit einer hohen TREM2-Expression der Immunzellen in den Lymphknotenmetastasen wiesen jedoch ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben auf ( $p=0,005$ ).



Anzahl:						
Niedrige TREM2-Expression	12	8	8	6	2	1
Hohe TREM2-Expression	21	7	4	1	0	0



Anzahl:						
Niedrige TREM2-Expression	12	10	9	7	3	2
Hohe TREM2-Expression	21	12	6	1	0	0

**Abbildung 21:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Mithilfe des Log-Rank-Tests erfolgte die statistische Auswertung der Überlebensdaten.

#### *5.4.2.4 Uni- und multivariate Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens*

Die univariate Analyse zeigte einen signifikanten Einfluss der TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 6,713; 95%CI: 1,475-30,554;  $p=0,005$ ) auf das progressionsfreie Überleben.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnten keine signifikanten Einflussfaktoren identifiziert werden.

In der Multivariat-Analyse wurde die TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 4,904; 95%CI: 1,003-23,987;  $p=0,050$ ) als annähernd signifikanter, unabhängiger Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben identifiziert.

Die Ergebnisse der Uni- und Multivariat-Analyse sind in den Tabellen 28 und 29 dargestellt.

**Tabelle 28:** Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Männlich vs. weiblich</b>	0,684 (0,193-2,429)	0,551	1,01 (0,325-3,137)	0,986
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	4,196 (1,197-14,706)	0,104	3,642 (1,173-11,36)	0,105
<b>UICC-Stadium</b>	<b>III vs. IV</b>	2,797 (0,627-12,474)	0,155	2,942 (0,665-13,02)	0,128
<b>TREM2-Immunezellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	6,713 (1,475-30,554)	0,005*	2,44 (0,782-7,61)	0,105

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

**Tabelle 29:** Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Marken sowie der TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen

Charakteristika		Gesamtüberleben		Progressionsfreies Überleben	
		HR (95%CI)	p-Wert	HR (95%CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>Männlich vs. weiblich</b>	0,73 (0,186-2,868)	0,652	1,356 (0,42-4,379)	0,611
<b>Alter</b>	<b>≤ 75 Jahre vs. &gt; 75 Jahre</b>	2,65 (0,681-10,304)	0,160	2,492 (0,731-8,489)	0,144
<b>UICC-Stadium</b>	<b>III vs. IV</b>	1,762 (0,382-8,126)	0,468	2,123 (0,44-10,25)	0,349
<b>TREM2-Immunezellen</b>	<b>Hoch vs. niedrig</b>	4,904 (1,003-23,987)	0,050	1,696 (0,464-6,201)	0,424

Signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert, Signifikanzniveau < 0,05

Abkürzungen: CI = confidence interval; HR = hazard ratio; UICC = Union internationale contre le cancer

## **5.5 FACS-Analyse zur TREM2-Expression**

Für die Untersuchung der Makrophagen im Hinblick auf die TREM2-Expression wurden Blut- und Gewebeproben durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung der Expression der verschiedenen Makrophagenmarker erfolgte prozentual. Aus allen gemessenen Werten wurde der Durchschnitt berechnet.

Wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der Student's t-Test mit Welch-Korrektur angewandt. Mithilfe der one-way ANOVA wurden mehrere Untergruppen miteinander verglichen.

### 5.5.1 Klinische und histopathologische Eigenschaften der Tumorkohorte

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Blutproben wurden 19 Patienten prospektiv eingeschlossen. Die Gatingstrategie ist exemplarisch an einer Patientenprobe in Abbildung 22 dargestellt.

Die Patientenkohorte setzte sich aus 10 (52,6%) Frauen und 9 (47,4%) Männern zusammen.

14 (73,7%) der Patienten waren  $\leq 75$  Jahre alt, wohingegen 5 (26,3%) der Patienten älter als 75 Jahre alt waren.

Die Größe sowie Infiltration der Primärtumoren wurde wie folgt histopathologisch klassifiziert: T1: 4 (21,1%), T2: 4 (21,1%), T3: 3 (15,8%), T4: 8 (41,1%).

Der Lymphknotenstatus wurde wie folgt histopathologisch beurteilt: N0: 14 (73,7%), N1: 1 (5,3%), N2a: 1 (5,3%), N2b: 2 (10,5%), N3b: 1 (5,3%).

Keiner der Patienten wies Fernmetastasen auf.

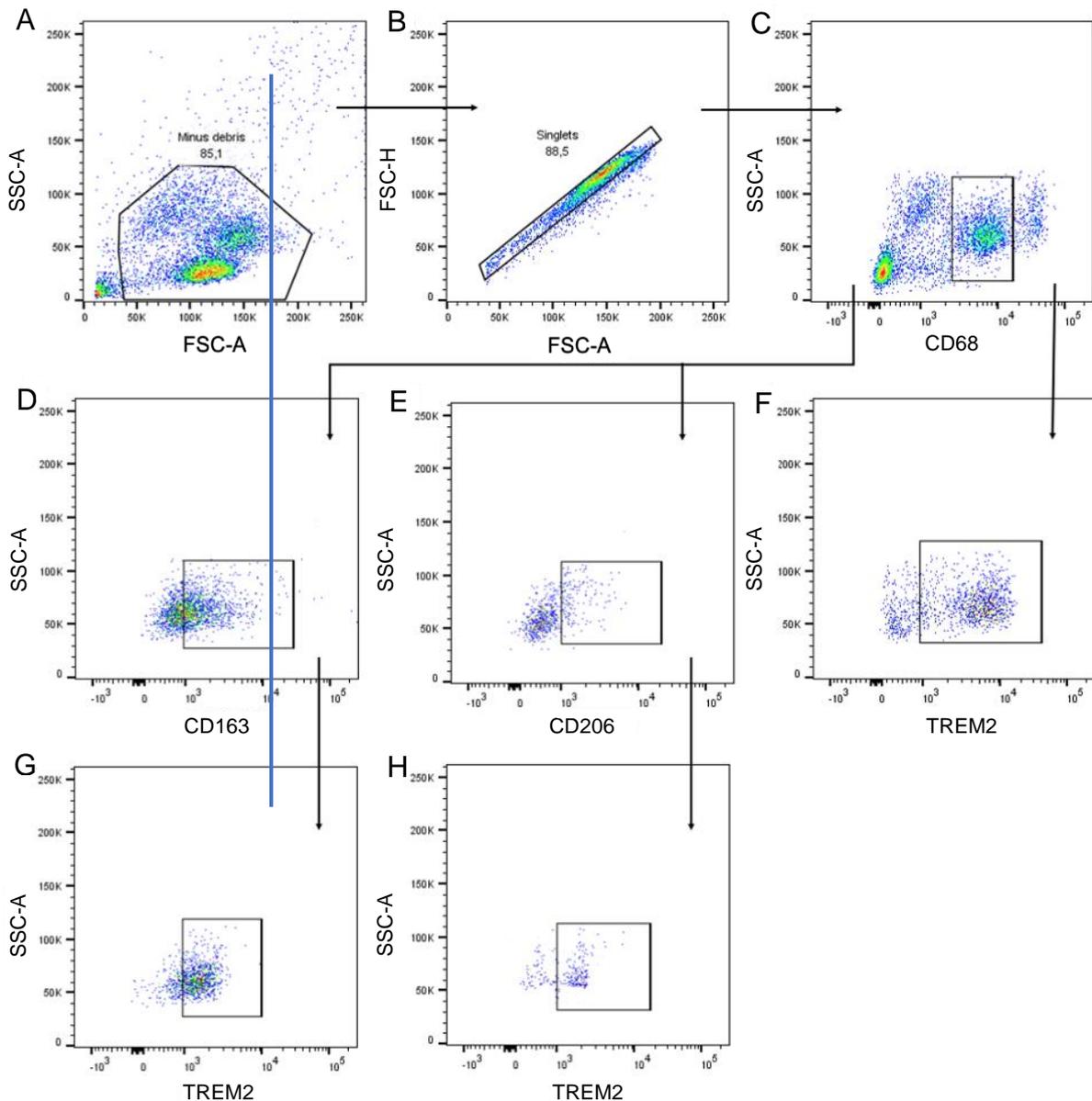
Anhand der TNM-Klassifikation wurden die Patienten in die folgenden UICC-Stadien eingeteilt: UICC-Stadium I: 4 (21,1%), II: 3 (15,8%), III: 3 (15,8%), IV: 9 (47,4%).

Die Differenzierung der Tumoren wurde wie folgt beurteilt: G1: 2 (10,5%), G2: 6 (42,1%), G3: 8 (42,1%).

Die Kohorte der gesunden Kontrollpatienten setzte sich aus 4 Patienten zusammen. Diese waren jeweils zur Hälfte männlich und weiblich (je zwei, 50%). 3 (75%) der Patienten waren  $\leq 75$  Jahre alt, 1 Patient (25%) war älter als 75 Jahre.

Die Zusammensetzung der Kohorte der Tumorkohorte unterschied sich hinsichtlich der Zugehörigkeit zu den Altersgruppen  $\leq 75$  und  $> 75$  Jahre (t-Test,  $p=0,987$ ) sowie dem Geschlecht (t-Test,  $p=0,522$ ) nicht signifikant von der der gesunden Kontrollpersonen.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorten ist in Tabelle 30 dargestellt.



**Abbildung 22:** Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) auf die Expression von CD68, CD163, CD206 und TREM2.

(A) Zunächst erfolgte anhand der Größe und Granularität der Zellen mithilfe der SSC-A- und FSC-A-Gates der Ausschluss von zellulärem Debris. (B) Zellen, die aneinander adhärerten und keinen Einzelzellstrahl bildeten, wurden ausgeschlossen. Singlets zeichnen sich hierbei durch einen linearen Zusammenhang zwischen FSC-A und FSC-H aus. (C) CD68<sup>+</sup>-Zellen wurden als Makrophagen definiert. Von den CD68<sup>+</sup>-Zellen wurden die ebenfalls (D) CD163<sup>-</sup>, (E) CD206<sup>-</sup> und (F) TREM2<sup>+</sup>-Zellen ermittelt. Von den (G) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> und (H) CD68<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>-Zellen wurde der Anteil der TREM2<sup>+</sup>-Zellen bestimmt.

Abkürzungen: FSC-A/H = forward scatter area/height; SSC-A = side scatter area

**Tabelle 30:** Auflistung der klinischen Parameter der Patientenkohorte für die durchflusszytometrische Untersuchung der TREM2-Expression

Charakteristika	Anzahl der Patienten (%)	Anzahl der gesunden Kontrollpatienten (%)
<b>Geschlecht</b>		
<b>Männlich</b>	9 (47,4)	2 (50)
<b>Weiblich</b>	10 (52,6)	2 (50)
<b>Alter</b>		
<b>≤ 75 Jahre</b>	14 (73,7)	3 (75)
<b>&gt; 75 Jahre</b>	5 (26,3)	1 (25)
<b>T-Klassifikation</b>		
<b>1</b>	4 (21,1)	
<b>2</b>	4 (21,2)	
<b>3</b>	3 (15,8)	
<b>4</b>	8 (41,1)	
<b>N-Klassifikation</b>		
<b>0</b>	14 (73,7)	
<b>1</b>	1 (5,3)	
<b>2a</b>	1 (5,3)	
<b>2b</b>	2 (10,5)	
<b>3b</b>	1 (5,3)	
<b>M-Klassifikation</b>		
<b>0</b>	19 (100)	
<b>1</b>	0 (0)	
<b>UICC-Stadium</b>		
<b>I</b>	4 (21,1)	
<b>II</b>	3 (15,8)	
<b>III</b>	3 (15,8)	
<b>IV</b>	9 (47,4)	
<b>Grading</b>		
<b>1</b>	2 (10,5)	
<b>2</b>	6 (31,6)	
<b>3</b>	8 (42,1)	
<b>Fehlend</b>	3 (15,8)	

Abbreviation: UICC = union internationale contre le cancer

### 5.5.2 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen der Tumor- und Kontrollpatientenkohorte

Die Expression von CD68, welches sowohl in M1- als auch in M2-Makrophagen exprimiert wird, CD163 und CD206 als M2-Makrophagenmarker sowie deren TREM2<sup>+</sup>-Anteil wurden in den PBMCs der Tumorpatienten als auch der gesunden Kontrollpersonen quantifiziert und miteinander verglichen.

Die Tumorpatienten in den UICC-Stadien III und IV wiesen im Allgemeinen einen höheren Anteil CD68<sup>+</sup>-Zellen auf als die Tumorpatienten in den UICC-Stadien I und II. Der Unterschied zwischen den Patienten des UICC-Stadiums IV und den Patienten der Stadien I ( $p < 0,001$ ) und II ( $p < 0,01$ ) war hochsignifikant. Die Expression von CD68 war zudem im UICC-Stadium III signifikant höher als im Stadium I ( $p < 0,05$ ). Zudem wiesen die Tumorpatienten in den Stadien III ( $p < 0,05$ ) und IV ( $p < 0,001$ ) einen signifikant höheren Anteil CD68<sup>+</sup>-Zellen auf als die gesunde Kontrollkohorte.

Bei der Auswertung des CD163<sup>+</sup>-Anteils der CD68<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich, dass dieser mit zunehmendem UICC-Stadium zunimmt. Der Vergleich zwischen dem UICC-Stadium I und den UICC-Stadien III und IV zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Zudem wiesen die Patienten im UICC-Stadium II einen signifikant geringeren CD163<sup>+</sup>-Anteil auf als Patienten in den Stadien III ( $p < 0,01$ ) und IV ( $p < 0,0001$ ). Ferner war der Unterschied zwischen den Patienten in den UICC-Stadien III ( $p < 0,05$ ) und IV ( $p < 0,0001$ ) zu den Kontrollpatienten hochsignifikant.

Der CD206<sup>+</sup>-Anteil der CD68<sup>+</sup>-Zellen hat mit zunehmendem UICC-Stadium ebenfalls zugenommen. Hierbei war der Unterschied zwischen dem UICC-Stadium I und dem UICC-Stadium IV signifikant ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der CD206-Expression im UICC-Stadium IV und der Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

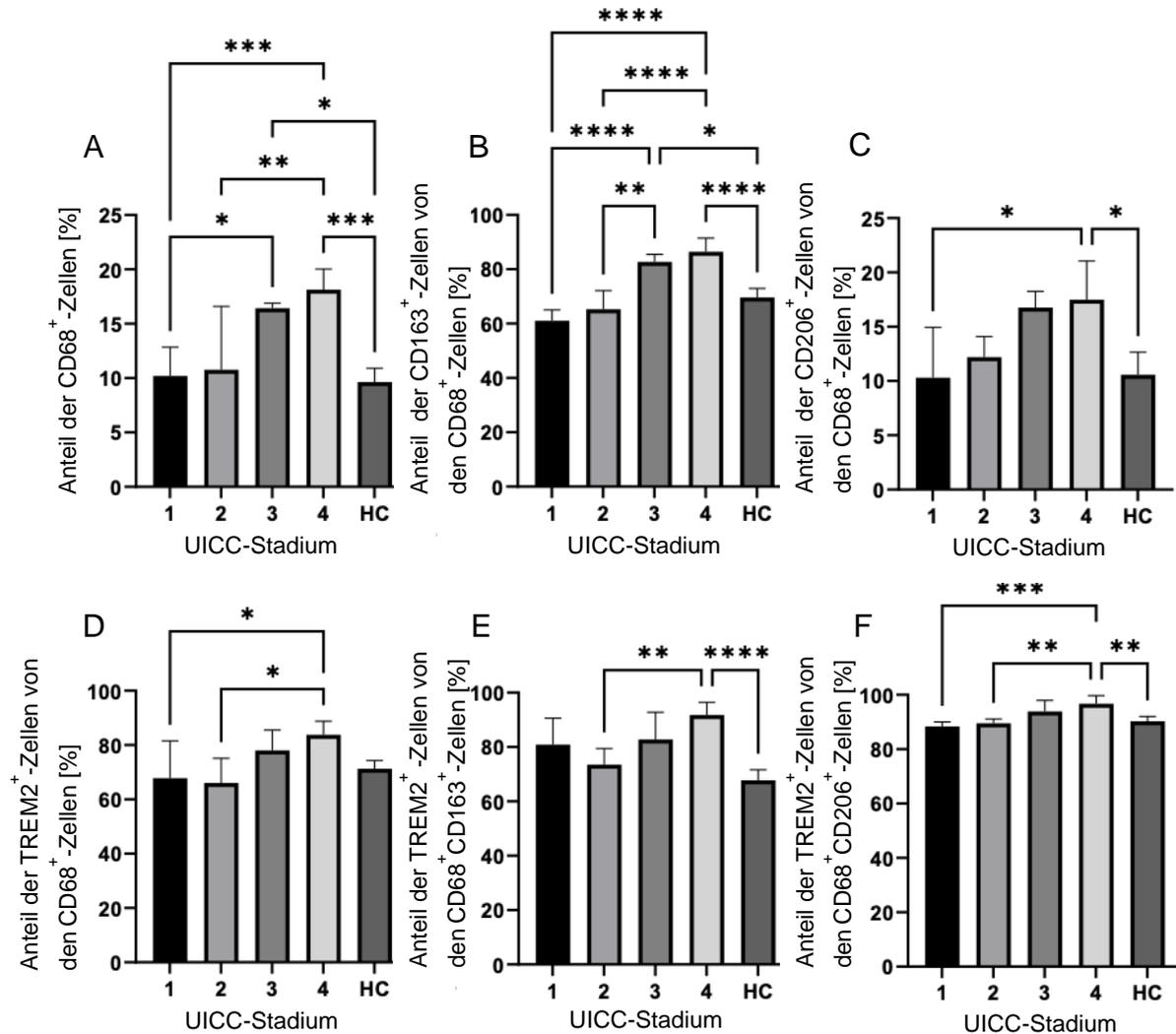
Der Anteil der TREM2<sup>+</sup>-Zellen der CD68<sup>+</sup>-Zellen war bei den Patienten in den UICC-Stadien I und II niedriger als in den Stadien III und IV. Der Unterschied zwischen dem UICC-Stadium IV und den Stadien I und II war signifikant ( $p < 0,05$ ). Es konnte jedoch kein

signifikanter Unterschied hinsichtlich der TREM2-Expression der CD68<sup>+</sup>-Zellen zwischen den Tumorpatienten und der gesunden Kontrollkohorte beobachtet werden.

Hinsichtlich der TREM2-Expression der CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem UICC-Stadium II und dem UICC-Stadium IV gefunden werden ( $p < 0,01$ ). Ebenfalls war die TREM2-Expression der Tumorpatienten im UICC-Stadium IV hochsignifikant höher als die der Kontrollpatienten ( $p < 0,0001$ ).

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Auswertung des TREM2<sup>+</sup>-Anteils der CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>-Zellen. Die TREM2-Expression in dem UICC-Stadium IV war hochsignifikant höher als in den Stadien I ( $p < 0,001$ ) und II ( $p < 0,01$ ). Zudem konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Expression im UICC-Stadium IV und der gesunden Kontrollkohorte festgestellt werden ( $p < 0,01$ ).

Die Abbildung 23 zeigt die vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen.



**Abbildung 23:** Quantifizierung und Vergleich der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zwischen der Patientenkohorte mit oralem Plattenepithelkarzinom, subgruppiert in die jeweils vorliegenden UICC-Stadien, und der gesunden Kontrollkohorte.

Die Graphiken zeigen den jeweiligen prozentualen Anteil der (A) CD68<sup>+</sup>-Zellen sowie deren (B) CD163<sup>+</sup>- und (C) CD206<sup>+</sup>-Anteil. Im nächsten Schritt erfolgte die Ermittlung der prozentualen TREM2<sup>+</sup>-Anteile der (D) CD68<sup>+</sup>-, (E) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>- und (F) CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>-Zellen.

Die prozentualen Anteile sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Asterisken markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

\* markiert einen p-Wert <0,05, \*\* markiert einen p-Wert <0,01, \*\*\* markiert einen p-Wert <0,001 und \*\*\*\* markiert einen p-Wert <0,0001.

### 5.5.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Analyse von Tumor und angrenzendem gesunden Normalgewebe des OSCCs hinsichtlich der Abundanz von Makrophagen und TREM2-exprimierenden Makrophagen dargestellt.

Im Allgemeinen waren mehr CD68<sup>+</sup>-, CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Makrophagen im Tumorgewebe als im angrenzenden gesunden Nachbargewebe lokalisiert.

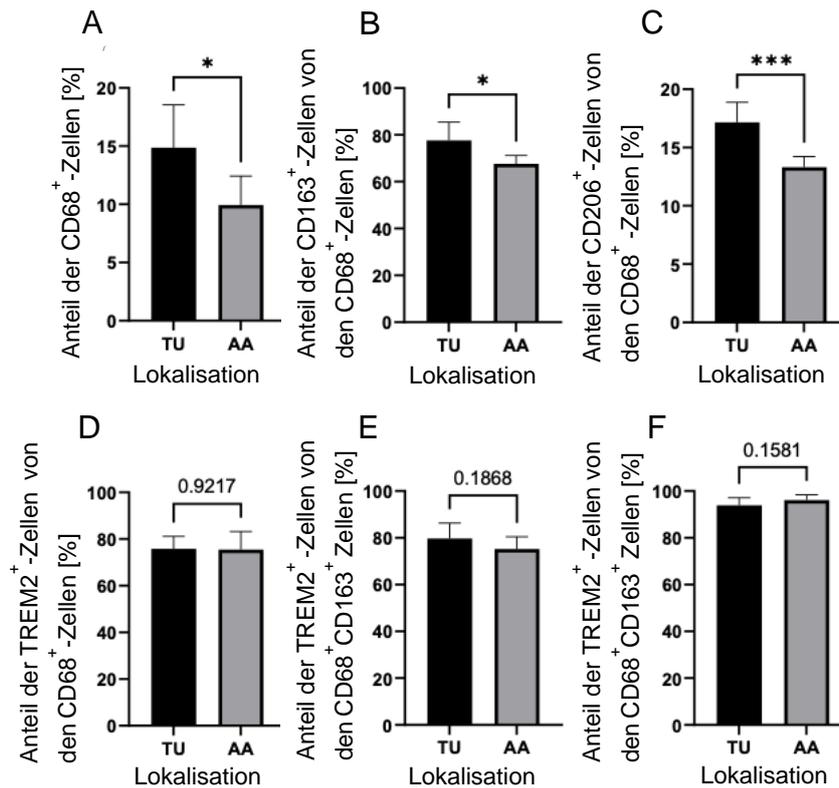
Im Tumorgewebe waren signifikant mehr CD68<sup>+</sup>-Zellen als im Nachbargewebe lokalisiert ( $p < 0,05$ ).

Zudem war der CD163<sup>+</sup>-Anteil der CD68<sup>+</sup>-Zellen im Tumorgewebe signifikant höher als im Nachbargewebe ( $p < 0,05$ ).

Ebenfalls war der Anteil CD206<sup>+</sup>-Zellen an den CD68<sup>+</sup>-Zellen im Tumorgewebe hochsignifikant höher als im Nachbargewebe ( $p < 0,001$ ).

Im Gegensatz dazu konnten vergleichbare TREM2<sup>+</sup>-Anteile der CD68<sup>+</sup>- ( $p = 0,9217$ ), CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>- ( $p = 0,1868$ ) und CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>-Zellen ( $p = 0,1581$ ) zwischen Tumor- und Nachbargewebe festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24:** Quantifizierung und Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor (TU)- und gesundem Nachbargewebe (adjacent area, AA).

Die Abbildungen zeigen den Anteil der (A) CD68<sup>+</sup>-Zellen (B) sowie deren CD163<sup>+</sup>- und (C) CD206<sup>+</sup>-Anteile. Nachfolgend wurde der TREM2<sup>+</sup>-Anteil der (D) CD68<sup>+</sup>-, (E) CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>- und (F) CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>-Zellen bestimmt.

Die prozentualen Anteile sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Asteriske markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

\* markiert einen p-Wert  $<0,05$  und \*\*\* markiert einen p-Wert  $<0,001$ .

## **5.6 ELISA der sTREM2-Konzentration**

Serumproben von Tumorpatienten wurden mithilfe eines ELISAs auf die sTREM2-Konzentrationen untersucht.

Die Patientenkohorte entsprach der, deren Blutproben durchflusszytometrisch ausgewertet wurden. Die Patientencharakteristika sind Tabelle 30 zu entnehmen.

Zur Ermittlung potentieller Korrelationen zwischen der sTREM2-Konzentration und klinischen sowie histopathologischer Charakteristika wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

### 5.6.1 Korrelation der sTREM2-Konzentration im Serum mit klinisch und histopathologischen Charakteristika

Die sTREM2-Konzentration im Serum wurde auf eine potentielle Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern untersucht. Die sTREM2-Konzentration zeigte keine Korrelation mit dem Geschlecht ( $p=0,430$ ) und dem Alter ( $p=0,171$ ). Im Gegensatz dazu konnte eine positive Korrelation mit dem Fortschritt der malignen Erkrankung festgestellt werden. Die Korrelationen verfehlten hierbei jedoch knapp das Signifikanzniveau (T-Klassifikation:  $p=0,081$ ; Nodalstatus:  $p=0,085$ ; UICC-Stadium:  $p=0,059$ ).

**Tabelle 31:** Korrelation der sTREM2-Konzentration mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften

Charakteristika	Spearman's Rho	p-Wert
Geschlecht	0,192	0,430
Alter	-0,327	0,171
T-Klassifikation	0,410	0,081
N-Klassifikation (N0/N+)	0,405	0,085
UICC-Stadium	0,441	0,059

Abkürzung: UICC = Union internationale contre le cancer

## 6. Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methodik

#### 6.1.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von im Gewebe vorhandenen Antigenen. Ein Vorteil ist hierbei die Möglichkeit der Auswertung des Lokalisationsmusters des zu bestimmenden Antigens (Kern, Membran, Zytoplasma).

Die Grenzen der immunhistochemischen Verfahren liegen bei der Standardisierung und Quantifizierung der Färbung und der Sensitivität der Detektionssysteme. Die Verwendung unterschiedlich gut bindender Antikörper zum Nachweis eines Antigens erschwert die Vergleichbarkeit zwischen immunhistochemischen Färbungen und ist einer der Gründe für diskrepante Literaturangaben hinsichtlich der Expression verschiedener Antigene.

Ein weiterer Grund für unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Antigenexpression sind die unterschiedlichen, nicht-standardisierten Scoring-Systeme und die variable Auslegung von Cut-off-Werten.

In der vorliegenden Arbeit wurden TMAs immunhistochemisch gefärbt. TMAs erlauben die simultane Analyse von bis zu tausend Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger. Dies hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von verschiedenen Gewebeproben unter den gleichen Bedingungen, zeit- und materialschonend getestet werden kann (Bubendorf et al., 2001; Kallioniemi et al., 2001; Milanes-Jahreley et al., 2002; Moch et al., 2001; Nocito et al., 2001). Die zur Analyse zur Verfügung stehende Gewebeprobe ist bei TMAs im Vergleich zu Großschnitten jedoch stark verkleinert (pro Gewebestanze 0,6 mm Durchmesser). Dies hat auf der einen Seite den Vorteil einer gewebeschonenden Methodik, wodurch eine hohe Anzahl von Analysen der gleichen Gewebeprobe möglich ist, zum anderen stellt sich jedoch die Frage, ob Proben dieses Durchmessers repräsentativ für einen gesamten Tumor sind (Nocito et al., 2001). Validierungsstudien haben hierbei jedoch eine exzellente Konkordanz zwischen der TMA-Methode und Großschnitten gezeigt (Camp et al., 2000; Hedvat et al., 2002; Hoos et al., 2001). Dennoch ergibt sich bei der Analyse von TMAs der Nachteil, dass sich durch Fehlstanzen von nekrotischen Tumorealen oder von Tumorrandbereichen mit ausschließlich physiologischem Epithel die evaluierbaren Bereiche verringern.

Insgesamt stellt die immunhistochemische Analyse von TMAs jedoch eine etablierte Methode zur Charakterisierung von Gewebeproben, v.a. Tumorproben, dar, die eine hohe Durchsatzrate an Untersuchungen mit wenig Gewebematerial erlaubt.

### 6.1.2 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde 1968 erstmals beschrieben (Dittrich et Göhde, 1968). Der größte Vorteil der heute meist als Mehrfarbenfluoreszenz-Analyse (Multi-Color-Analyse) durchgeführten Methode ist die Möglichkeit der sehr schnellen, zeitgleichen Charakterisierung und Phänotypisierung von Zellen anhand mehrerer Marker. Dies wird ermöglicht durch die Verwendung mehrerer Laser unterschiedlicher Exzitationslängen sowie durch Fluorochrome unterschiedlicher Emissionsspektren.

Eine zuvor erfolgte, sorgfältige Auswahl von Fluorochromen erleichtert und ermöglicht die korrekte Durchführung und Messung. Bei der Auswahl der Fluorochrome sind zum einen deren Exzitations- und Emissionsspektren (und somit der Spillover) zu beachten, zum anderen ihre Intensität, Abgrenzbarkeit und Stabilität. Zu erwartend kleine Populationen sollten mit einem Antikörper hoher Intensität gefärbt werden (z.B. BV 421, PE). Fluorochrome mit ähnlichen Exzitations- und Emissionsspektren können nicht im selben Panel verwendet werden (z.B. APC und AF647). Zum anderen sollte bei der Färbung von intrazellulären Antigenen beachtet werden, dass hierfür Fluorochrom-Moleküle einer geringen Größe verwendet werden, damit diese das jeweilige Antigen bei Platz-kompromittierten Verhältnissen in der Zelle erreichen können (d.h. keine Tandem-Konjugate wie z.B. PE-Cy5). Um Fehlmessungen zu vermeiden, sollten zudem bevorzugt lichtstabile Fluorochrome ausgewählt werden (z.B. Alexa 647 statt APC; McKinnon, 2018).

Trotz der sorgfältigen Auswahl der Fluorochrome besteht dennoch das Problem der spektralen Überlappung der Fluorochrome. Um dieser zu entgegnen, muss eine Kompensation (im Sinne eines anteiligen Abziehens der benachbarten Emissionsspektren) durchgeführt werden. Diese wird, wie in dieser Arbeit, in der Regel mithilfe von Compensation Beads (bestehend aus Polystyrol-Partikeln) durchgeführt. Das Ziel hierbei sind klar voneinander abgrenzbare Zellpopulationen.

Eine weitere Methode zur Identifikation positiver und negativer Zellpopulationen ist das Prinzip der FMO. Hierfür wird eine Probe mit allen Antikörpern eines Panels gefärbt,

wohingegen bei den anderen Proben jeweils ein Antikörper weggelassen wird. Wenn Zellen, welche nicht mit dem jeweiligen Fluorochrom gefärbt wurden, dennoch ein positives Signal in dem Detektor des zu testenden Fluorochroms aufweisen, muss das Signal durch eine Veränderung der Spannungen eliminiert werden (Hulspas et al., 2009). Diese Methode hat den Vorteil, dass zum einen auch das Einstrahlen von Signalen anderer Fluorochrome, zum anderen aber auch die Autofluoreszenz der Zellen kontrolliert werden kann.

Bei der Vorbereitung der Proben für die durchflusszytometrischen Untersuchungen haben sich weitere Schwierigkeiten ergeben: Für die Messung von Leukozytenpopulationen ist es notwendig, eine Zellseparation vorzunehmen, da die Leukozyten im humanen Vollblut zu einer deutlich geringeren Anzahl vorkommen als die Erythrozyten ( $4.000$  bis  $15 \times 10^3/\mu\text{L}$  vs.  $4$  bis  $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ). Für die Zellseparation kann zwischen der Erythrozytenlyse- und der Dichtegradientenzentrifugation-Methode gewählt werden. Bei der Methode der Dichtegradientenzentrifugation basiert die Zellseparation auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Zellpopulationen. Dadurch können unerwünschte Zellen aus der Probe entfernt werden. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass es während der Probenaufbereitung zum Verlust bedeutsamer Zellpopulationen (v.a. Granulozyten) kommen kann. Die Erythrozytenlyse stellt im Gegensatz dazu eine vergleichsmäßig einfache und zeitsparende Methode dar. Da bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit die Dichtegradientenzentrifugation jedoch deutlich reliablere und reproduzierbarere Ergebnisse lieferte (dies lässt sich ggf. auf einen Verlust von Antigenstrukturen und die Zerstörung von Antikörpern durch das in dem Erythrozytenlyse-Puffer enthaltene Formaldehyd zurückführen) und keine Differenzen in den in dieser Arbeit gemessenen Zellpopulationen zwischen beiden Methoden bestanden, wurde die Methodik der Dichtegradientenzentrifugation gewählt.

Eine Herausforderung der Messung intrazellulärer Antigene (in dieser Arbeit CD68, CD163, CD206 und IDO1) stellte die Erreichbarkeit und Anfärbbarkeit dieser Antigene dar. Vitale Zellen weisen eine für die Antikörper normalerweise undurchdringliche Doppellipidschicht als Zellmembran auf, sodass vor dem Färbeprozess die Notwendigkeit der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen besteht.

Bei diesem Prozess besteht die Problematik, dass die Antigene auf der Oberfläche der Zellen, aber auch zuvor durch einen Färbeschritt bereits Fluorochrom-gekoppelte Antikörper durch die teilweise aggressiven Fixierungslösungen und Detergenzien zerstört

werden. Eine Verwendung von nicht ausreichend starken Detergenzien hätte jedoch die Folge, dass einige intrazelluläre Antigene in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation durch den Antikörper nicht erreicht werden könnten. Um dies zu vermeiden, müssen das Detergens, die Fixierungslösung und die Reihenfolge der Färbeschritte sorgfältig ausgewählt und getestet werden. Je nach Zielantigen kann die Verwendung unterschiedlicher Fixierungs- und Permeabilisierungsreagenzien notwendig sein. In der vorliegenden Arbeit wurden eine Fixierung mittels Paraformaldehyd (in unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Panel) sowie eine Permeabilisierung mit Methanol durchgeführt. Die extrazellulären Antigene wurden vor der Fixierung und Permeabilisierung gefärbt. Hierfür wurden Fluorochrome ausgewählt, welche als recht resistent gegenüber dem Fixierungs- und Permeabilisierungsvorgang gelten, dies sind u.a. BV421 und AF647. Im Gegensatz dazu gelten die Fluorochrome PE und APC als sehr empfindlich gegenüber den verwendeten Reagenzien. Insgesamt konnten unter Beachtung der zuvor erwähnten Aspekte reproduzierbare Ergebnisse ohne Verlust von Antigenstrukturen erzielt werden.

### 6.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mithilfe des ELISAs kann eine quantitative Bestimmung von Antigenen in einer Probe durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Methoden des Sandwich-ELISAs sowie die des kompetitiven ELISAs angewandt.

Das Sandwich-ELISA weist eine besonders hohe Spezifität auf. Im Vergleich dazu ermöglicht das kompetitive ELISA jedoch auch die Messung von kleinen Antigenen, die zu klein sind, um von zwei verschiedenen Antikörpern (wie beim Sandwich-ELISA) gebunden zu werden (Engvall E, 2010; Kohl et Ascoli, 2017).

Generell weisen die ELISAs eine hohe Sensitivität auf (Engvall E, 2010; Kohl et Ascoli, 2017). Durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Verarbeitung einer hohen Probenanzahl sowie die Automatisierung des Messprozesses handelt es sich zudem um eine recht kosten- und zeitsparende Methode.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse zu IDO1

Die Bedeutung von IDO1 in der Regulation der lokalen und systemischen, tumorinitiierten Immunsuppression konnte bislang nicht gänzlich aufgeklärt werden. Es gibt bereits seit zwei Jahrzehnten Versuche, die IDO1-Inhibition therapeutisch zu nutzen. Bisher blieben größere Erfolge in den klinischen Studien jedoch aus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die IDO1-Expression in Epithel- und Immunzellen von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des OSCCs auf TMAs immunhistochemisch untersucht. Im nächsten Schritt erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung von PBMCs und dissoziierten Gewebeproben (Tumorgewebe und gesundes Nachbargewebe) auf die Abundanz verschiedener Makrophagenpopulationen und deren IDO1-Expression.

Eine zum Teil sehr kontrovers diskutierte Alternative zur Bestimmung der IDO1-Expression ist die Messung der IDO1-Aktivität. Als Surrogat für die IDO1-Aktivität gilt die Ratio aus Kyn und Trp. Hierfür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ELISAs aus Serumproben durchgeführt und die Kyn/Trp-Ratio auf ihre Eignung als Biomarker geprüft. Im nächsten Schritt wurde die IDO1-Aktivität im Serum auf eine Korrelation mit der IDO1-Expression der PBMCs und epithelialen Tumorzellen des OSCCs untersucht.

IDO1 wird ein wesentlicher Beitrag zur Immunsuppression und Immuntoleranz im gesamten Körper zugesprochen. Um die IDO1-Expression und -Aktivität auch im postoperativen Verlauf beurteilen zu können und diese auf ihre Eignung als prädiktive Biomarker zu untersuchen, wurden die Blutproben der Tumorpatienten auch ein und zwei Wochen post operationem analysiert und miteinander verglichen.

### 6.2.1 IDO1-Expression im Tumor

Im retrospektiven Teil dieser Arbeit wurde die IDO1-Expression in Epithelzellen und Immunzellen von Primärtumoren des OSCCs immunhistochemisch auf TMAs bestimmt.

Eine hohe IDO1-Expression in Immunzellen war signifikant mit einer fortgeschrittenen Tumorgroße (SRC,  $p=0,010$ ), einem Lymphknotenbefall (SRC,  $p=0,008$ ) sowie einem fortgeschrittenen UICC-Stadium (SRC,  $p=0,026$ ) assoziiert, wohingegen eine hohe IDO1-

Expression in Epithelzellen hochsignifikant mit einer niedrigen T- und N-Klassifikation sowie niedrigen UICC-Stadien korrelierte (SRC,  $p < 0,001$ ).

Zudem zeigte die epitheliale IDO1-Expression eine signifikante Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p = 0,046$ ), einem Patientenalter  $\leq 75$  Jahre (SRC,  $p = 0,017$ ) und dem Auftreten eines Rezidivs (SRC,  $p = 0,021$ ).

Die Abundanz IDO1<sup>+</sup>-Immunzellen zeigte ebenfalls eine Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p = 0,006$ ). Sie war jedoch im Vergleich zur IDO1-Expression in Epithelzellen mit einem Alter  $> 75$  Jahre assoziiert (SRC,  $p = 0,019$ ).

In der Multivariat-Analyse wiesen die IDO1-Expression in Epithelzellen (HR: 2,073; 95%CI: 0,959-4,479;  $p = 0,064$ ) sowie die IDO1-Expression in Immunzellen (HR: 1,416; 95%CI: 0,967-2,074;  $p = 0,074$ ) einen annähernd signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben auf.

Es ist bekannt, dass IDO1 im tumoralen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe vermehrt exprimiert wird (Zheng et al., 2021). Jedoch gibt es sehr kontroverse Studienergebnisse zur Höhe der Expression sowie deren Korrelation mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften. Dies lässt sich zumindest zum Teil darauf zurückführen, dass die IDO1-Expression in Epithel- und Immunzellen in zuvor publizierten Daten nicht getrennt bestimmt wurde.

Laimer et al. untersuchten die Expression und prognostische Bedeutung von IDO1 in Primärtumoren des OSCCs mithilfe von immunhistochemischen Färbungen auf Proteinebene sowie mittels Polymerase chain reaction (PCR) auf Genebene. Anders als in dieser Arbeit wurde die IDO1-Expression jedoch nicht getrennt zwischen Epithel- und Immunzellen ausgewertet. Laimer et al. konnten keine signifikante Korrelation zwischen der IDO1-Expression und dem UICC-Stadium, dem Alter, der Lokalisation und dem Grading des Tumors finden. Die Korrelation der IDO1-Expression mit dem Geschlecht war jedoch nahezu signifikant (Laimer et al., 2011). In der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkohorte konnte ebenfalls eine höhere IDO1-Expression in den Epithel- und Immunzellen der Primärtumoren von Frauen beobachtet werden. Hieraus könnte geschlussfolgert werden, dass es auch bei der klinischen Anwendung der IDO1-Inhibitoren unterschiedliche geschlechtsspezifische Ansprechraten gibt. Dies konnte in den bisher durchgeführten klinischen Studien jedoch nicht beobachtet werden (Clinical

Des Weiteren beschrieben Laimer et al., dass Patienten, die eine adjuvante Radio-Chemotherapie oder adjuvante Chemotherapie erhielten, ein schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen, sofern ihre Tumore eine hohe IDO1-Expression zeigten (Laimer et al., 2011).

Seppälä et al. untersuchten die IDO1-Expression in Zungenkarzinomen mittels Immunhistochemie und zeigten, dass diese eine höhere IDO1-Expression aufweisen als linguale Hyperplasien. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten sie keine signifikante Korrelation zwischen der IDO1-Expression und der Tumorgöße, Tumordinfiltrationstiefe (in mm) oder der peritumoralen Inflammation beobachten. In dem von Seppälä et al. untersuchten Patientenkollektiv bestand jedoch eine signifikante Korrelation zwischen der IDO1-Expression und der Anzahl der Lymphknotenmetastasen sowie der Anzahl der Lymphknotenmetastasen mit extranodalem Wachstum.

Zudem zeigten sie, dass Patienten, die eine hohe IDO1-Expression aufweisen sowie zudem einen Primärtumor  $\geq 2$  cm, Lymphknotenmetastasen oder eine hohe Inflammation peritumoral zeigen, ein schlechteres krankheitsspezifisches und Gesamtüberleben aufweisen (Seppälä et al., 2016).

Zheng et al. untersuchten die IDO1-Expression des OSCCs mithilfe von quantitativer PCR (qPCR), Western Blot und Immunhistochemie und zeigten eine negative Korrelation zwischen der IDO1-Expression und dem Überleben (Zhang et al., 2021).

Ye et al. untersuchten die IDO1-Expression in Larynxkarzinomen und fanden eine annähernd signifikante Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors (T1/T2 vs. T3/T4) und der IDO1-Expression. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wiesen die T3/T4-Tumoren jedoch eine geringere IDO1-Expression auf. Das krankheitsspezifische sowie Gesamtüberleben der Patienten mit hoher IDO1-Expression war signifikant schlechter (Ye et al., 2013).

### 6.2.2 IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Im retrospektiven Teil dieser Arbeit wurde die IDO1-Expression in Epithelzellen und Immunzellen von Lymphknotenmetastasen des OSCCs immunhistochemisch auf TMA's bestimmt.

Die intrametastatische, epitheliale IDO1-Expression zeigte eine signifikante Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p=0,039$ ). Ebenfalls zeigte die IDO1-Expression in Immunzellen eine Korrelation mit dem weiblichen Geschlecht, diese verfehlte jedoch das Signifikanzniveau (SRC,  $p=0,079$ ). Die IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen zeigte außerdem eine signifikante, positive Korrelation mit dem Auftreten eines Rezidivs (SRC,  $p=0,038$ ). In der Multivariat-Analyse konnte die IDO1-Expression in intrametastatischen Immunzellen als signifikanter, unabhängiger Einflussfaktor auf das progressionsfreie Überleben identifiziert werden (HR: 1,951; 95%CI: 1,079-3,528;  $p=0,027$ ).

In den zuvor publizierten Daten wurde äquivalent zur IDO1-Expression in Primärtumoren nicht zwischen Epithel- und Immunzellen unterschieden.

Seppälä et al. untersuchten die IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen von Zungenkarzinomen und fanden eine signifikante Korrelation mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen mit extranodalem Wachstum. Zudem war eine hohe IDO1-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit einem schlechteren krankheitsspezifischen und Gesamtüberleben assoziiert (Seppälä et al., 2016).

Weitere Daten zur IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen der HNSCC liegen nicht vor.

Brody et al. beschäftigten sich mit der IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen des malignen Melanoms und beobachteten, dass alle Patienten mit einer kurzen Überlebenszeit eine moderate bis starke IDO1-Expression in den Lymphknotenmetastasen aufwiesen, wohingegen 80% der Patienten mit einem längeren Gesamtüberleben nur eine schwache oder sogar keine IDO1-Expression zeigten. Eine hohe IDO1-Expression korrelierte zudem signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben (Brody et al., 2009).

Speeckaert et al. untersuchten ebenfalls die IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen des malignen Melanoms und beobachteten ein signifikant schlechteres progressionsfreies und Gesamtüberleben von Patienten mit einer hohen IDO1-Expression (Speeckaert et al., 2012).

### 6.2.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und Kontrollpatientenkohorte

Den Makrophagen im TME wird eine Schlüsselrolle in der tumorinitiierten Immunsuppression zugeschrieben, indem sie in Wechselwirkung mit den Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr treten. Die durch die Makrophagen veränderte Immunantwort beeinflusst die Tumorprogression (Goncalves et al., 2013) und trägt somit möglicherweise zu einer systemischen Toleranz bei (Battaglia et al., 2009).

Um nicht nur den lokalen, sondern auch den systemischen Einfluss von IDO1 zu untersuchen, wurden die PBMCs von Tumorpatienten, subgruppiert nach den vorliegenden UICC-Stadien, sowie von gesunden Kontrollpatienten auf die Abundanz von CD68<sup>+</sup>-, CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Makrophagen sowie deren IDO1-Expression untersucht.

Insgesamt waren sowohl der Anteil der Gesamtmakrophagenpopulation sowie der der M2-Makrophagen bei Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien (III/IV) höher als in niedrigen Stadien (I/II) sowie in der gesunden Kontrollgruppe (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Dies spricht für eine Abnahme der M1-Makrophagen mit zunehmendem UICC-Stadium.

Es gibt bereits Untersuchungen dazu, dass es im OSCC zu einer Umpolarisierung der Makrophagenpopulationen von M1- (pro-inflammatorisch) zu M2-Makrophagen (anti-inflammatorisch) und damit zu einer tumorsupportiven Mikroumgebung gibt. Die Umpolarisierung geht mit einer zunehmenden Tumorgröße und -infiltration (T-Klassifikation), einer erhöhten Metastasierungsrate in die Lokoregionären Lymphknoten sowie einer höheren Tumorprogression und schlechteren Prognose einher (Alves et al., 2017; Haque et al., 2019; Kondoh et al., 2019; Okubo et al., 2016; Petruzii et al., 2017; Shigeoka et al., 2019; Weber et al., 2014; Weber et al., 2016; Wehrhan et al., 2013).

Weber et al. zeigten bereits, dass sogar in oralen Leukoplakien ein erhöhtes Vorkommen an M2-polarisierten Makrophagen für eine wahrscheinlichere maligne Transformation spricht (Weber et al., 2020). Im Umkehrschluss kann man aus diesen Ergebnissen folgern, dass eine Umpolarisierung zu M1-Makrophagen möglicherweise eine Tumورprogression verhindern oder zumindest verlangsamen könnte.

Herrera-Rios et al. beschrieben Makrophagen in zerebralen Metastasen des malignen Melanoms als Hauptquelle der IDO1-Expression (Herrera-Rios et al., 2020). Ebenfalls konnten Choe et al. IDO1 auf M2-Makrophagen des Hodgkin-Lymphoms detektieren und fanden hierbei eine Assoziation von IDO1-exprimierenden M2-Makrophagen mit einem schlechteren Überleben (Choe et al., 2014).

Im in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnte eine signifikant höhere IDO1-Expression bei OSCC-Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien (III/IV) als bei Patienten in niedrigen Stadien (I/II) und den gesunden Kontrollpersonen beobachtet werden (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Zudem war die IDO1-Expression in CD68<sup>+</sup>- und CD163<sup>+</sup>-Zellen der Patienten im UICC-Stadium IV signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Auch die CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen der Patienten im UICC-Stadium IV wiesen eine annähernd signifikant höhere IDO1-Expression auf als die gesunde Kontrollgruppe (ANOVA,  $p = 0,0595$ ).

Insgesamt kann hieraus geschlussfolgert werden, dass die Immunzellen von Tumorpatienten mit zunehmender Tumorlast auch eine höhere IDO1-Expression aufweisen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese, dass IDO1 die Tumورprogression sowie die Immuntoleranz des Körpers gegenüber dem Tumor positiv beeinflusst.

Die Bestimmung der IDO1-Expression könnte allgemein bei der Zuteilung der Patienten zu einer IDO1-inhibierenden Therapie helfen. Im Speziellen könnte die Bestimmung der Last der IDO1-exprimierenden Makrophagen dabei helfen, gezielt die Patienten zu selektieren, die von einer combination targeted therapy profitieren könnten.

#### 6.2.4 Postoperativer Verlauf der IDO1-Expression

Es ist bekannt, dass die IDO1-Expression durch Entzündungsmediatoren wie IFN- $\gamma$  getriggert wird und hierdurch die Immunaktivität im gesunden Organismus beeinflusst wird (Munn et al., 1999; Munn et al., 2004; Tattevin et al., 2010; Taylor et Feng, 1991). Bisher sind die Veränderungen der IDO1-Expression sowie der IDO1-Aktivität im postoperativen Verlauf jedoch unbekannt.

Um die postoperativen Veränderungen evaluieren zu können, wurde von den Tumorpatienten zum Zeitpunkt der Operation, eine Woche post operationem sowie zwei Wochen post operationem Blut abgenommen.

Insgesamt konnte eine Zunahme der IDO1-Expression von Tag 0 bis Tag 7 beobachtet werden. Dies haben wir auf die nach der Operation herrschende inflammatorische Reaktion zurückgeführt. Nach dem siebten Tag hat die IDO1-Expression signifikant abgenommen (t-Test,  $p=0,01$ ). Dies könnte in dem Wegfall der tumorinitiierten Immunsuppression begründet liegen. Nach 14 Tagen erreichte die IDO1-Expression annähernd das präoperative Niveau.

Bemerkenswert war die signifikante Abnahme der IDO1-Expression in CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der zwei Wochen post operationem (t-Test,  $p<0,05$ ).

Ggf. spiegelt sich zwei Wochen post operationem noch die erhöhte postoperative inflammatorische Aktivität wider, sodass die IDO1-Expression weiteren Einflüssen unterliegt.

MacFarlane et al. konnten zu späteren Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der PD-L1 Expression im Blut nach der Tumorresektion nachweisen (MacFarlane et al., 2014)

Insgesamt wäre deswegen eine Beobachtung der Werte im weiteren Verlauf sowie bei Auftreten eines Rezidivs interessant.

### 6.2.5 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe

Es wurde die Abundanz der Makrophagen sowie deren IDO1-Expression zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe verglichen.

Es konnte ein signifikant höherer Anteil CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen intratumoral als peritumoral gefunden werden. Zudem exprimierte ein signifikant höherer Anteil der CD68<sup>+</sup>-und CD163<sup>+</sup>-Zellen im Tumor IDO1 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Dass sich die Abundanz der CD68<sup>+</sup>-Zellen zwischen dem Tumor- und gesundem Nachbargewebe nicht unterschied, wohingegen vermehrt CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen im Tumorgewebe zu finden waren, spricht für eine intratumorale Zunahme der M2-Makrophagen sowie im Umkehrschluss für eine Abnahme der M1-Makrophagen im Tumor. Dieses Phänomen wurde bereits durch Henze et Mazzone beschrieben (Henze et Mazzone, 2016). Die Polarisation zu M2-Makrophagen wird durch die im Tumor herrschende Hypoxie gefördert (Tripathi et al., 2014). Chanmee et al. beschrieben zudem, dass die intratumoral herrschende Hypoxie die Migration von TAMs hindert und diese dadurch zunehmend akkumulieren (Chanmee et al., 2014).

Die unterschiedliche Verteilung der Makrophagen könnte auch der Grund für die sehr differierenden Beschreibungen über die prognostische Bedeutung der CD68-Expression in verschiedenen Malignomen sein.

Ein erhöhtes Vorkommen von CD68<sup>+</sup>-TAMs in Biopsien wurde mit einer schlechteren Prognose diverser Malignome assoziiert (Lymphome (Farinha et al., 2005), Mamma- (Leek et al., 1996), Harnblasen- (Hanada et al., 2000), Magen- (Ishigami et al., 2003), Pankreaskarzinome (Di Caro et al., 2016)). Im Gegensatz dazu beobachteten Chaput et al. und Forssell et al. eine positive Korrelation der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen mit der Prognose beim kolorektalen Karzinom (Chaput et al., 2013; Forssell et al., 2007). Welsh et al. und Dai et al. beschrieben hingegen beim Lungenkarzinom, dass nur TAMs im Tumorstroma mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Dai et al., 2010; Welsh et al., 2005).

Eine Beurteilung der prognostischen Bedeutung der Makrophagen war im Rahmen dieses Dissertationsprojektes nicht möglich, da die Studie prospektiv geplant wurde.

Zheng et al. zeigten, dass die IDO1-Expression intratumoral signifikant höher ist als peritumoral (Zheng et al., 2021). Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass v.a. die M1-Makrophagen intratumoral eine höhere IDO1-Expression aufweisen, wohingegen sich die IDO1-Expression der M2-Makrophagen nicht signifikant zwischen dem Tumor- und gesundem Nachbargewebe unterschied.

Die Anreicherung der M2-Makrophagen im Tumorgewebe impliziert einen höheren Therapieerfolg der gezielten Inhibition von M2-Makrophagen ggf. auch synergistisch im Rahmen einer combination targeted therapy mit einem IDO1-Inhibitor im Vergleich zur ausschließlichen IDO1-Inhibition.

#### 6.2.6 Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie deren Ratio

Die Kyn/Trp-Ratio wird als Maß für die IDO1-Aktivität postuliert. Der Vorteil der Bestimmung der IDO1-Aktivität im Serum anstelle der intrazellulären IDO1-Expression ist die deutlich leichtere methodische Durchführbarkeit und damit geringere Fehleranfälligkeit. Neben der Ratio wurde auch den einzelnen Stoffwechselprodukten in zuvor publizierten Daten eine prognostische Bedeutung zugesprochen.

Im untersuchten OSCC-Patientenkollektiv konnten ein Anstieg der Kyn-Konzentration und der Kyn/Trp-Ratio sowie eine Abnahme der Trp-Konzentration im Serum mit zunehmender T-Klassifikation beobachtet werden.

Die Kyn- und Trp-Konzentration sowie die Kyn/Trp-Ratio unterschieden sich in der Patientengruppe mit T4-Tumor annähernd bzw. sogar signifikant von denen der HCs (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Dass keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen mit unterschiedlich großen Tumoren vorlagen, könnte auf die großen interindividuellen Schwankungen der Konzentrationen zurückgeführt werden.

Bemerkenswert war, dass sich sowohl die Trp- und Kyn-Konzentrationen als auch ihre Ratio bei Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen signifikant unterschieden haben (t-Test,  $p < 0,05$ ). Dementsprechend scheint eine hohe Kyn/Trp-Ratio das Vorliegen von lokoregionären Lymphknotenmetastasen zu implizieren.

Mandarano et al. zeigten, dass eine Abnahme der Trp-Konzentration sowie eine Zunahme der Kyn-Konzentration im peripheren Blut mit einem verringerten Trp-Gehalt im TME einhergehen und zudem mit einem erhöhten Risiko für einen Tumorprogress sowie einem schlechteren Outcome bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom assoziiert sind (Mandarano et al., 2021).

Zhang et al. zeigten, dass die Kyn/Trp-Ratio im Serum bei OSCC-Patienten signifikant höher ist als bei HCs (Zheng et al., 2021). Dies zeigten auch Engin et al., welche die Kyn/Trp-Ratio bei Patienten mit kolorektalem Karzinom untersuchten (Engin et al., 2016).

Suzuki et al. beschrieben, dass eine erhöhte Kyn/Trp-Ratio mit einer weiter fortgeschrittenen Erkrankung des Lungenkarzinoms assoziiert ist (Suzuki et al., 2010).

Des Weiteren gibt es zahlreiche Untersuchungen, welche sich mit dem Einfluss der Kyn/Trp-Ratio bzw. der Kyn-Konzentration im Serum auf das Überleben befassten.

Bisher publizierte Daten zeigen, dass eine erhöhte Kyn/Trp-Ratio im Serum mit einem kürzeren Gesamtüberleben bei der akuten myeloischen Leukämie (Corn et al., 2009) und beim malignen Melanom assoziiert ist (Weinlich et al., 2007). Zudem zeigten Ferns et al., dass eine erhöhte Kyn/Trp-Ratio mit einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben beim Zervixkarzinom korreliert (Ferns et al., 2015).

Mabuchi et al. beschrieben, dass erhöhte Kyn-Konzentration im Serum mit einem kürzeren Gesamtüberleben bei akuter myeloischer Leukämie korrelierten (Mabuchi et al., 2016). Dies zeigten auch Yoshikawa et al., welche eine Korrelation erhöhter Kyn-Konzentrationen mit einem kürzeren Gesamtüberleben beim Non-Hodgkin-Lymphom beobachten konnten (Yoshikawa et al., 2010).

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass ein erhöhtes malignes Verhalten des Primärtumors eine immuntoleranzvermittelnde Situation fördert.

Engin et al. untersuchten die Kyn- und Trp-Konzentration sowie deren Ratio beim kolorektalen Karzinom. Sie fanden einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Kyn-

Konzentration und einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich der Kyn/Trp-Ratio von Tumor- und gesunden Patienten (Engin et al., 2016).

#### 6.2.7 Korrelation der Kyn/Trp-Ratio mit der IDO1-Expression in PBMCs und tumoralen Epithelzellen

Um die als Alternative zur Bestimmung der IDO1-Expression postulierte IDO1-Aktivität beurteilen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen der Höhe der Kyn/Trp-Ratio und der IDO1-Expression der PBMCs und epithelialen Zellen des OSCCs untersucht.

Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Kyn/Trp-Ratio im Serum und der IDO1-Expression in PBMCs beobachten werden (SRC,  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu korrelierte die Kyn/Trp-Ratio im Serum nicht mit der IDO1-Expression in epithelialen Zellen des OSCCs (SRC,  $p = 0,672$ ).

Diese Beobachtung entspricht der von Chevolet et al., die ebenfalls eine Korrelation der IDO1-Aktivität mit der IDO1-Expression der PBMCs von Patienten mit malignem Melanom beobachten konnten (Chevolet et al., 2015).

Im Gegensatz dazu gibt es Publikationen über eine positive Korrelation der IDO1-Aktivität mit der IDO1-Expression von tumoralen Epithelzellen des penilen Plattenepithelkarzinoms sowie des Zervixkarzinoms (Heeren et al., 2018 Zhou et al., 2020).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Kyn/Trp-Ratio die metabolische Aktivität der IDO1-exprimierenden Immunzellen widerspiegelt und sich als Alternative zur Bestimmung der IDO1-Expression in PBMCs eignet. Die Ergebnisse sprechen zudem gegen die von Badawy et Guillemain geübte Kritik, dass die Kyn/Trp-Ratio nicht nur durch die IDO1-Aktivität, sondern u.a. auch durch TDO-Aktivität innerhalb der Leber beeinflusst werde (Badawy et Guillemain, 2019).

### 6.2.8 Postoperativer Verlauf der Kynurenin- und Tryptophankonzentration sowie ihrer Ratio

Wie zuvor beschrieben, ist bereits bekannt, dass die IDO1-Expression durch Entzündungsmediatoren wie IFN- $\gamma$  getriggert wird und hierdurch die Immunaktivität im gesunden Organismus beeinflusst wird (Munn et al., 1999; Munn et al., 2004; Tattevin et al., 2010; Taylor et Feng, 1991). Bisher ist die Veränderung der IDO1-Aktivität im postoperativen Verlauf jedoch noch nicht bekannt.

Insgesamt hat die Kyn/Trp-Ratio postoperativ in der ersten Woche zugenommen und dann im Verlauf der zweiten Woche annähernd auf das präoperative Niveau wieder abgenommen. Der Unterschied zwischen der Kyn/Trp-Ratio zum Zeitpunkt der Tumorresektion und der Ratio zwei Wochen post operationem war annähernd signifikant (t-Test,  $p=0,067$ ). Das Verfehlen des Signifikanzniveaus kann ggf. auf die große interindividuelle Heterogenität zurückgeführt werden.

Es wäre eine Betrachtung im weiteren postoperativen Verlauf sowie bei Auftreten eines Rezidivs interessant, um die Eignung als prädiktiver und prognostischer Biomarker zu beurteilen.

Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass ein operativer Eingriff den Immunstatus, im Speziellen die IDO1-Expression und -Aktivität im Blut der Tumorpatienten beeinflusst. Gegebenenfalls könnte somit im Falle einer fernmetastasierten und somit systemischen Tumorerkrankung mit nur noch palliativem Therapieziel eine IDO1-Inhibition eine Alternative zum chirurgischen Eingriff (z.B. einem tumor debulking) darstellen oder neoadjuvant das Überleben verlängern.

### 6.3 Diskussion der Ergebnisse zu TREM2

Das Hauptaugenmerk der onkologischen Grundlagenforschung liegt zurzeit auf der Identifizierung tumorspezifischer Marker, die für die Entwicklung von neuen diagnostischen und individualisierten, zielgerichteten therapeutischen Strategien eingesetzt werden können.

TREM2 wurde im Jahr 2002 erstmals bei der Nasu-Hakola-Krankheit beschrieben und ist bis heute fast ausschließlich auf seine neurologische Bedeutung hin untersucht worden (Paloneva et al., 2002)

In der Mikroglia fördert TREM2 die Phagozytose von apoptotischen Neuronen und hemmt mittels des DAP12-Signalwegs die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen (Takahashi et al., 2005). Bei Übertragung der bisherigen Daten auf das TME lässt sich schlussfolgern, dass TREM2 eine immunsuppressive Wirkung hat.

Bisher liegen nur wenige Forschungsergebnisse und zum Teil sehr kontroverse Ergebnisse zu der TREM2-Expression verschiedener Tumoren vor. Kürzlich wurden jedoch sehr wegweisende Studienergebnisse darüber publiziert, dass TREM2 wesentlich zur Chemotherapie- und ICI-Resistenz beiträgt.

Xiong et al. beobachteten, dass ICI-resistente Tumoren eine TREM2-überexprimierende Makrophagensubpopulation aufweisen (Xiong et al., 2020).

Molgora et al zeigte, dass eine TREM2-Defizienz sowie Anti-TREM2-Antikörper zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums sowie zu einer kompletten Tumorregression in Mäusen führten, sofern eine Kombination mit einem Anti-PD-1-Antikörper erfolgte (Molgora et al., 2020).

Binnewies et al. beschrieben TREM2 als Grund für eine gescheiterte Anti-PD-1-Therapie. In der Folge untersuchten sie die Effektivität von Anti-PD-1- und einem Anti-TREM2-Antikörper im Mausmodell und konnten wie Molgora et al. bei Kombination dieser ein verbessertes Ansprechen beobachten. Sie stellen die Hypothese auf, dass Anti-TREM2-Antikörper bei Kombination mit einem Anti-PD1-Antikörper das Therapieansprechen durch

eine geförderte T-Zell-Infiltration bzw. Aktivierung und die Veränderung der TAM-Zusammensetzung verbessern (Binnewies et al., 2021; Molgora et al., 2020).

Es wird bereits ein anti-TREM2-Antikörper (PY314) im Rahmen der Studie NCT 04691375 mit und ohne Anti-PD-1-Antikörper bei soliden Tumoren erprobt (Binnewies et al., 2021)

Studien zur Bedeutung von TREM2 beim OSCC liegen jedoch zurzeit noch nicht vor.

### 6.3.1 TREM2-Expression im Tumor

Im retrospektiven Teil dieser Arbeit wurde die TREM2-Expression auf Immunzellen der Primärtumore des OSCCs immunhistochemisch auf TMAs bestimmt.

Tumoren, welche histopathologisch einer höheren T- (SRC,  $p=0,030$ ) und N-Klassifikation (SRC,  $p=0,050$ ) zugeordnet wurden, wiesen eine höhere Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen auf. Insgesamt korrelierten damit auch die UICC-Stadien signifikant mit der Anzahl TREM2<sup>+</sup>-Immunzellen (SRC,  $p=0,040$ ). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation der PD-L1-Expression mit der TREM2-Expression auf Immunzellen (SRC,  $p<0,001$ ).

Die Patienten mit einer hohen TREM2-Expression wiesen ein signifikant früheres Auftreten eines Tumorprogresses auf (Multivariat-Analyse, (HR: 2,17; 95%CI: 1,021-4,613;  $p=0,044$ ). Patienten mit einer hohen TREM2-Expression verstarben zudem signifikant früher (Multivariat-Analyse, HR: 2,548; 95%CI: 1,089-5,964;  $p=0,031$ )

Die bisher publizierten Ergebnisse zur Bedeutung der TREM2-Expression in Malignomen sind sehr heterogen und zum Teil widersprüchlich.

Cheng et al. beschrieben, dass eine erhöhte TREM2-Expression des Platten- und Adenokarzinom der Zervix, des diffusen B-Zell-Lymphoms, des pulmonalen Adenokarzinoms, des kutanen Melanoms sowie der thyreoidalen Karzinome mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben einhergeht. Im Gegensatz dazu beobachteten sie, dass Patienten mit einem niedriggradigen Gliom, einem hepatozellulärem sowie klarzelligen Nierenzellkarzinom bei einer erhöhten TREM2-Expression ein signifikant verringertes Gesamtüberleben aufweisen. Das krankheitsspezifische Überleben war in der Patientenkohorte von Cheng et al. bei einer TREM2-Überexpression in Platten- und

Adenokarzinomen der Zervix, thyreoidalen Karzinomen sowie niedriggradigen Gliomen signifikant schlechter (Cheng et al., 2021).

Zhang et al. zeigten sowohl beim Magenkarzinom als auch beim Nierenzellkarzinom, dass die mRNA- und Proteinexpression von TREM2 im Vergleich zum Normalgewebe erhöht sind (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Zudem fanden Zhang et al. eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen TREM2-Expression und dem Grading sowie der TNM-Klassifikation beim Magenkarzinom. Im Gegensatz dazu fanden sie keine Korrelation mit dem Geschlecht und dem Alter. In der Univariat- und Multivariat-Analyse zeigten sich die TREM2-Expression sowie die TNM-Klassifikation als signifikante unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben (Zhang et al., 2018).

Wang et al. untersuchten die TREM2-Expression in Gliomen mittels Immunhistochemie. Die TREM2-Expression korrelierte signifikant mit dem WHO-Stadium. Es konnte jedoch keine Korrelation mit dem Geschlecht, Alter oder der Tumorgröße gefunden werden. Zudem wiesen Patienten mit einer hohen TREM2-Expression ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben auf (Wang et al., 2016)

Esparza-Baquer konnten eine signifikant höhere TREM2-Expression in T4-Tumoren des hepatozellulären Karzinoms im Vergleich zu T1-Tumoren feststellen (Esparza-Baquer et al., 2021)

Cheng et al. konnten in ihrer Pan-Cancer-Analyse beobachten, dass die TREM2 im HNSCC im Vergleich zum Normalgewebe erhöht ist. Sie konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebensraten von Patienten mit einer hohen und niedrigen tumoralen TREM2-Expression beobachten. Im Gegensatz zu der Analyse in dieser Arbeit erfolgte die Analyse hier jedoch auf Genebene (Cheng et al., 2021).

Insgesamt sind die bisherigen Ergebnisse sehr heterogen. Dies hebt die Bedeutung der Bestimmung der TREM2-Expression in verschiedenen Tumoren hervor, um die Tumoren zu selektieren, deren Patienten potentiell von einer Anti-TREM2-Therapie profitieren könnten. Patienten mit einem OSCC könnten entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von einer Anti-TREM2-Therapie profitieren.

### 6.3.2 TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen

Im retrospektiven Teil dieser Arbeit wurde die TREM2-Expression der Immunzellen in Lymphknotenmetastasen des OSCCs immunhistochemisch auf TMAs bestimmt.

Eine hohe TREM2-Expression in den Immunzellen der Lymphknotenmetastasen korrelierte mit dem weiblichen Geschlecht (SRC,  $p=0,008$ ), einem Alter  $> 75$  Jahre (SRC,  $p=0,042$ ) und einer hohen PD-L1-Expression (SRC,  $p=0,022$ ).

In der Multivariat-Analyse wurde die TREM2-Expression in Immunzellen (HR: 4,904; 95%CI: 1,003-23,987;  $p=0,05$ ) als annähernd signifikanter, unabhängiger Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben identifiziert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der TREM2-Expression in Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen gefunden werden (t-Test,  $p=0,330$ ).

Auffällig war die Hochregulierung von TREM2 in den Lymphknotenmetastasen von Männern (t-Test,  $p<0,001$ ), wohingegen sich die Expressionen bei Frauen zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen nicht signifikant unterschied (t-Test,  $p=0,669$ ). Dies könnte auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung von TREM2 sowie unterschiedliche Ansprechraten der Anti-TREM2-Immuntherapie bei Vorliegen von lokoregionären Lymphknotenmetastasen hindeuten.

Die positive Korrelation der PD-L1-Expression mit der TREM2-Expression in den Lymphknotenmetastasen deutet auf einen vielversprechenden Therapieansatz der kombinierten PD-L1- und TREM2-Therapie bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen hin.

Malgora et al. konnten ebenfalls TREM2<sup>+</sup>-Makrophagen sowohl in lokoregionären Lymphknoten als auch hepatischen und pulmonalen Fernmetastasen solider Tumoren nachweisen (Malgora et al., 2020).

Patienten mit lokoregionären Metastasen eines OSCC könnten entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit von einer Anti-TREM2-Immuntherapie profitieren.

### 6.3.3 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und Kontrollpatientenkohorte

Im nächsten Schritt wurde die TREM2-Expression der PBMCs untersucht.

Da v.a. den Makrophagen eine Schlüsselrolle in der ICI-Resistenz zugeschrieben wird, wurde im Speziellen die Abundanz von CD68<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>- Makrophagen und deren TREM2-Expression ermittelt. Um einen Vergleich ziehen zu können, wurden ebenfalls die PBMCs gesunder Kontrollpatienten untersucht.

Insgesamt war sowohl der Anteil der Gesamtmakrophagen sowie der der M2-Makrophagen bei Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien größer als in niedrigen Stadien sowie in der gesunden Kontrollgruppe. Dies spricht im Umkehrschluss für eine Abnahme der M1-Makrophagen mit zunehmendem UICC-Stadium.

Kumar et al. zeigten in einer Metaanalyse, dass eine Zunahme der Makrophagen bei HNSCC-Patienten auch mit einer signifikanten Zunahme der Größe und Infiltration des Tumors (T-Klassifikation) sowie einem positiven Lymphknotenstatus einhergeht (Kumar et al., 2019).

He et al. beschrieben ebenfalls, dass eine höhere Infiltration mit CD68<sup>+</sup>- oder CD163<sup>+</sup>- Makrophagen mit einer höheren T- und N-Klassifikation des OSCCs korreliert (He et al., 2014).

Suárez-Sánchez et al. stellten fest, dass eine höhere Infiltration mit CD68<sup>+</sup>- oder CD163<sup>+</sup>- Zellen mit einer höheren T-Klassifikation (T3, T4), fortgeschrittenen UICC-Stadien (III und IV) sowie schlecht bzw. undifferenzierten Tumoren assoziiert ist (Suárez-Sánchez et al., 2020).

Im Gegensatz dazu konnten Haque et al. keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der CD163<sup>+</sup>-Zellen und klinisch sowie histopathologischen Merkmalen feststellen. Im Gegensatz dazu beschrieben sie jedoch, dass eine erhöhte Anzahl von CD206<sup>+</sup>-Zellen mit einer höheren T- und N-Klassifikation sowie höheren UICC-Stadien einhergeht (Haque et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine höhere TREM2-Expression bei Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien als bei Patienten in niedrigen Stadien und den gesunden Kontrollpatienten beobachtet werden. Die beiden M2-Makrophagen-Subpopulationen, die CD68<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen, wiesen bei Patienten im UICC-Stadium IV eine signifikant höhere TREM2-Expression auf als die Kontrollpatienten (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern oder den Altersgruppen ( $\leq 75$  und  $> 75$  Jahre) beobachtet werden.

Yao et al. zeigten, dass TREM2 auf den PBMCs und TAMs von Lungenkarzinom-Patienten sowie erkrankten Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten überexprimiert wird. Zudem beobachteten sie eine positive Korrelation zwischen der TREM2-Expression auf Pulmonalmakrophagen und dem UICC-Stadium sowie dem Lymphknotenstatus bei Patienten mit Lungenkarzinom (Yao et al., 2016).

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte ergänzt werden, dass sogar die TREM2-Expression auf PBMCs im UICC-Stadium IV des OSCCs im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten signifikant höher ist (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Die TREM2-Expression auf den PBMCs der Patienten in den UICC-Stadien I und II war jedoch ähnlich zu der der gesunden Kontrollpatienten.

Insgesamt kann hieraus geschlossen werden, dass auch die PBMCs von Tumorpatienten mit zunehmender Tumorlast eine höhere TREM2-Expression aufweisen.

#### 6.3.4 Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe

Es wurde die Verteilung der TAMs sowie deren TREM2-Expression zwischen Tumor- und gesundem Nachbargewebe verglichen. Hierfür wurden Gewebeproben dissoziiert und die Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD68, CD163, CD206, CD326 und TREM2 untersucht.

Es konnte ein signifikant höherer Anteil CD68<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>- und CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>-Zellen intratumoral als peritumoral gefunden werden (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Haque et al. untersuchten die Expression von CD163 und CD206 in Proben des OSCC. Sie beschrieben, dass CD163<sup>+</sup>-Zellen gleichermaßen intra- und peritumoral zu finden sind, wohingegen CD206<sup>+</sup>-Zellen hauptsächlich intratumoral lokalisiert sind. Sie konnten jedoch keine Korrelationen der CD163<sup>+</sup>- und CD206<sup>+</sup>-Zellen mit dem Alter, Geschlecht, der Tumorlokalisation, den UICC-Stadien, der T- und N-Klassifikation, dem Grading sowie dem Auftreten lokaler Rezidive und Fernmetastasen finden. Das progressionsfreie und krankheitsspezifische Überleben unterschied sich zwischen den Patienten mit einer hohen und niedrigen CD163-Expression nicht, wohingegen beide Überlebensraten bei Patienten mit einer hohen CD206-Expression im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen CD206-Expression signifikant schlechter waren (Haque et al., 2019).

Gao et al. beobachteten beim HNSCC, dass die Expression von CD68 intratumoral signifikant höher ist als peritumoral (Gao et al., 2018).

Die bisherigen Ergebnisse sprechen somit für eine intratumorale Zunahme der M2-Makrophagen sowie im Umkehrschluss eine Abnahme der M1-Makrophagen im Tumor. Dieses Phänomen wurde bereits durch Henze et Mazzone beschrieben (Henze et Mazzone, 2016). Die Polarisation zu M2-Makrophagen wird durch die im Tumor herrschende Hypoxie gefördert (Tripathi et al., 2014). Chanmee et al. beschrieben zudem, dass die intratumoral herrschende Hypoxie die Migration von TAMs hindert und diese dadurch zunehmend akkumulieren (Chanmee et al., 2014).

Die unterschiedliche Verteilung der Makrophagen könnte auch der Grund für die sehr differierenden Beschreibungen über die prognostische Bedeutung der CD68-Expression in verschiedenen Malignomen sein.

Ein erhöhtes Vorkommen von CD68<sup>+</sup>-TAMs in Biopsien wurde mit einer schlechteren Prognose diverser Malignome assoziiert (Lymphome (Farinha et al., 2005), Mamma- (Leek et al., 1996), Harnblasen- (Hanada et al., 2000), Magen- (Ishigami et al., 2003), Pankreaskarzinome (Di Caro et al., 2016)). Im Gegensatz dazu beobachteten Chaput et al. und Forssell et al. eine positive Korrelation der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen mit der Prognose beim kolorektalen Karzinom (Chaput et al., 2013; Forssell et al., 2007). Welsh et al. und Dai et al. beschrieben hingegen beim Lungenkarzinom, dass nur TAMs im Tumorstroma mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Dai et al., 2010; Welsh et al., 2005).

Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen beschrieben Kong et al. beim hepatozellulären Karzinom eine signifikante Anreicherung von CD68<sup>+</sup>- und CD163<sup>+</sup>-Zellen peritumoral. Zudem konnten sie eine negative Korrelation zwischen der Abundanz CD68<sup>+</sup>-Zellen und dem rezidivfreien sowie Gesamtüberleben feststellen, wohingegen die CD163<sup>+</sup>-Zellen keinen Einfluss auf das Überleben hatten (Kong et al., 2013).

Li et al. fanden beim Zervixkarzinom eine signifikant höhere CD163-Expression intratumoral als peritumoral (Li et al., 2017).

Salmi et al. beobachteten beim malignen Melanom, dass die Anzahl der TAMs in tiefer infiltrierenden malignen Melanomen (Breslow-Level > 4mm) sowie Lymphknotenmetastasen höher ist als in superfiziellen Melanomen (Breslow-Level < 1mm). Zudem war die Abundanz CD68<sup>+</sup>-Zellen mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert, wohingegen eine hohe Anzahl CD163<sup>+</sup>-Zellen mit einer geringeren Rezidivhäufigkeit sowie mit einem besseren Gesamtüberleben einherging (Salmi et al., 2019). Im Gegensatz dazu beschrieben Bronkhorst et al. in malignen Melanomen der Uvea, dass eine geringe CD68- bzw. CD68/CD163-Expression mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert sind (Bronkhorst et al., 2011).

Fan et al. beobachteten beim hepatozellulären Karzinom eine signifikant höhere CD206-Expression intratumoral als peritumoral. Zudem wies das Tumorgewebe eine signifikant höhere CD206-Expression auf als gesundes Lebergewebe. Die CD206-Expression im hepatozellulären Karzinom korrelierte signifikant mit der Tumorgroße und dem Auftreten von Metastasen. Das rezidivfreie Überleben war bei Patienten mit einer hohen CD206-Expression zudem signifikant kürzer (Fan et al., 2019).

Es gab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der TREM2-Expressionen auf Makrophagen intra- und peritumoral ( $p < 0,05$ ). Interessanterweise konnte bei den immunhistochemischen Färbungen eine höhere intratumorale TREM2-Expression detektiert werden.

Khantakova et al. beobachteten beim hepatozellulären Karzinom eine Akkumulation von TREM2-exprimierenden Zellen intratumoral, wohingegen nur wenige TREM2<sup>+</sup>-Zellen im Nachbargewebe gefunden werden konnten (Khantakova et al., 2022).

Dies zeigten ebenfalls Esparza-Baquer, welche eine Hochregulation von TREM2 in Gewebe von hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zum gesunden Lebergewebe nachweisen konnten (Esparza-Baquer et al., 2021).

Zhang et al. untersuchten zudem die TREM2-Expression im Nierenzellkarzinom im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe und fanden eine signifikant höhere TREM2-Expression intratumoral (Zhang et al., 2016).

Zhang et al. untersuchten zwei Jahre später zudem die TREM2-Expression des Magenkarzinoms intra- und peritumoral und fanden hierbei eine hochsignifikant höhere TREM2-Expression intratumoral als im gesunden Nachbargewebe (Zhang et al., 2018).

Wang et al. untersuchten die TREM2-Expression in Gliomen und normalem Hirngewebe und fanden eine signifikant höhere TREM2-Expression im Tumorgewebe (Wang et al., 2016).

Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass TREM2 peritumoral zu einem größeren Teil von anderen Zellen (z.B. dendritischen Zellen; Bouchon et al., 2001) exprimiert wird.

Eine Beurteilung der prognostischen Bedeutung der Makrophagen war im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, da die Studie prospektiv geplant wurde.

Die Anreicherung der TAMs im OSCC und in vielen anderen Tumoren könnte für einen höheren Therapieerfolg der gezielten Inhibition von TAMs bzw TREM2 mit eher geringeren systemischen Nebenwirkungen sprechen.

#### 6.3.5 sTREM2-Konzentration

Die Bedeutung von sTREM2 ist bei neurologischen Erkrankungen bisher deutlich besser erforscht als bei malignen Erkrankungen.

Bisher wurde eine höhere sTREM2-Konzentration in Liquorproben von Morbus Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne kognitive Einschränkungen beschrieben (Shen

et al., 2019; Zhong et al., 2017). Hierbei scheinen die sTREM2-Konzentrationen im Liquor in der frühen symptomatischen Phase des Morbus Alzheimers am höchsten zu sein und dann wieder abzunehmen, wenn die Krankheit fortschreitet (Ma et al., 2020; Suarez-Calvet et al., 2016). Zudem beobachteten Ma et al., dass eine erhöhte sTREM2 Konzentration mit einer erhöhten Tau-Konzentration einhergeht, wohingegen eine niedrige TREM2-Konzentration mit einer niedrigen A $\beta$ -Konzentration einherging (Ma et al., 2020).

Ebenfalls konnte eine erhöhte sTREM2-Liquorkonzentration bei Multiple Sklerose-Patienten beobachtet werden (Kleinberger et al., 2014).

Generell wurde sTREM2 jedoch bereits zugeschrieben, dass es die Apoptose von Makrophagen verhindert und das Zellüberleben (Wu et al., 2015), die Zellproliferation und Zellmigration fördert (Zhong et Cheng, 2019).

Bei Übertragung auf maligne Erkrankungen lässt sich schlussfolgern, dass sTREM2 eine immunsuppressive Wirkung hat.

Die Bedeutung von sTREM2 bei Malignomen wurde bisher ausschließlich in Serumproben von Patienten mit High-Grade-Gliomen sowie nicht-glialen Hirntumoren untersucht. Die sTREM2-Konzentration war hierbei sowohl im Serum der Patienten mit High-Grade-Gliomen als bei Patienten mit non-glialen Tumoren signifikant erniedrigt (Efendioğlu et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Gegensatz dazu eine Korrelation der sTREM2-Konzentration in Serumproben von OSCC-Patienten mit der T- (SRC,  $p=0,081$ ) und N-Klassifikation (SRC,  $p=0,085$ ) sowie den UICC-Stadien (SRC,  $p=0,059$ ), wobei diese das Signifikanzniveau knapp verfehlte.

Da es sich bei sTREM2 um das Abbauprodukt von TREM2 handelt, steht die Beobachtung der positiven Korrelation zwischen der sTREM2-Konzentration und dem UICC-Stadium im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen jedoch dafür, dass die sTREM2-Konzentration ggf. durch weitere, noch nicht weiter erforschte, biologische Vorgänge beeinflusst wird.

#### 6.4 Schwächen und Stärken der Arbeit

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Expression von CD68, CD163 und CD206 als Makrophagenmarker untersucht.

CD68 ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches hauptsächlich in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten der Makrophagen lokalisiert ist (Holness et al., 1993; Chistiakov et al., 2017). Jedoch wurde eine CD68-Expression auch in andere Zellen beschrieben, hierunter neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen (Amanzada et al., 2013; Gottfried et al., 2008; Pulford et al., 1990; Saito et al., 1991). Dementsprechend kann die Quantifizierung der Gesamtpopulation der Makrophagen mithilfe der Bestimmung der CD68-Expression zu einer Überschätzung der Gesamtmakrophagenpopulation geführt haben.

Makrophagen können in zwei Zuständen vorliegen, einerseits dem klassisch aktivierten, pro-inflammatorischen (anti-tumoralen) M1 Phänotyp und andererseits dem alternativ aktivierten, anti-inflammatorischen (pro-tumoralen) M2 Phänotyp.

Die Makrophagen können hierbei durch die Expression unterschiedlicher CD-Moleküle subklassifiziert werden: CD68 ist ein Pan-Makrophagen-Marker, wohingegen M1-Makrophagen typischerweise CD11c und M2-Makrophagen typischerweise CD163, CD204 oder CD206 exprimieren (Kaku et al., 2014; Komohara et al., 2006; Komohara et al., 2014). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die klassische M1/M2-Klassifikation aufgrund der hohen Makrophagenplastizität Grenzen aufweist und dass v.a. die TAMs sehr heterogen sind (Skytthe et al., 2020).

An den vorherigen Arbeiten, die sich mit der Makrophagenpolarisation befasst haben, wurde kritisiert, dass es für die Subklassifizierung der M2-Makrophagen nicht ausreicht, die CD163<sup>+</sup>-Zellen zu bestimmen (Suárez-Sánchez et al., 2020). Dies unterlegte auch das Ergebnis von Bronkhorst et al., welche die CD68-, CD163-, CD68/CD163-Expression in Zellen des malignen Melanoms der Uvea untersuchten und hierbei keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Überlebensraten zwischen Patienten mit einer hohen und einer niedrigen CD163-Expression fanden. Im Gegensatz dazu war das Überleben der Patienten mit einer hohen CD68- oder sowohl CD68- und CD163-Expression in den gleichen Zellen signifikant schlechter (Bronkhorst et al., 2011).

Mithilfe des FACS war es im Rahmen der Durchführung der Experimente dieser Dissertation möglich, die Zellen zu selektieren, die sowohl CD68 (als Marker der Gesamtmakrophagenpopulation) als auch CD163 exprimieren, zu bestimmen. Zusätzlich wurde mit CD206 ein neuer, weniger erforschter M2-Makrophagen-Marker untersucht, da es Hinweise darauf gibt, dass es sich bei den M2-Makrophagen auch hinsichtlich ihrer pro-tumoralen Aktivität nicht um eine homogene Gruppe handelt.

Ein Nachteil der Verwendung von frischen Gewebeproben für die Durchflusszytometrie war, dass nur ein sehr kleiner Teil des Tumors bzw. des gesunden Nachbargewebes hierfür verwendet werden konnte, da dieser Teil nicht der histopathologischen Begutachtung zugeführt werden konnte. Hierdurch konnten in dieser Gruppe auch nur Gewebeproben von T3- und T4-Tumoren ausgewertet werden, wohingegen mithilfe der Immunhistochemie auch kleinere Tumoren ausgewertet werden konnten.

Ein weiterer Nachteil war, dass die Einzelzellsuspensionen nach der Dissoziation sehr unterschiedliche Anzahlen von Zellen aufwiesen, dies auch bei zuvor vergleichbaren Größen und Gewichten der Tumorproben. Dies kann vermutlich zumindest zum Teil auf nekrotisches und fibröses Gewebe zurückgeführt werden. Dennoch konnten durch die pro Messung benötigte Zellzahl von  $2 \times 10^6$  (jeweils  $1 \times 10^6$  für die eigentliche Messung und die Negativkontrolle) nicht alle dissoziierten Gewebeproben ausgewertet werden.

Die geringe Patientenanzahl erfordert zudem die Bestätigung der Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv.

Insbesondere wäre hier die Untersuchung der IDO1- und TREM2-Expression in den Tumoren von Rezidivpatienten interessant, da es bereits Ergebnisse zur erfolgreichen neoadjuvanten Anwendung eines PD-1-ICIs bei einer jungen Patientin mit Rezidiv eines OSCC gibt (Olmos et al., 2021).

Ein Nachteil der prospektiven Studienplanung des zweiten Teils dieser Arbeit war, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Auswertung der Überlebensdaten erfolgen konnte.

## 6.5 Schlussfolgerung

IDO1 und TREM2 konnten als potentielle Biomarker des OSCCs identifiziert werden und könnten im Rahmen der Therapieindividualisierung (personalisierte Medizin) zur Therapiestratifizierung und -optimierung beitragen.

Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium könnten von einer gegen die Biomarker gerichteten Immuntherapie profitieren. Dies ggf. auch in Kombination mit einem Anti-PD-1-Antikörper.

Nach klinischer Revalidierung könnte die Kyn/Trp-Ratio (als IDO1-Aktivität) zukünftig zur Therapiestratifizierung von Patienten mit lokoregionär metastasiertem oralem Plattenepithelkarzinom unter Berücksichtigung individueller Risikoprofile in die Routinediagnostik implementiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. American Association for Cancer Research (AACR). Companies Scaling Back IDO1 Inhibitor Trials. *Cancer Discov* 2018;8:OF5.
2. Abrahão R, Perdomo S, Pinto LFR, Nascimento de Carvalho F, Dias FL, de Podestá JRV, Venterin von Zeidler S, Marinho de Abreu P, Vilensky M, Giglio RE, Oliveira JC, Mineiro MS, Kowalski LP, Ikeda MK, Cuello M, Munyo A, Rodríguez-Urrego PA, Hakim JA, Suarez-Zamora DA, Cayol F, Figari MF, Oliver J, Gaborieau V, Keogh RH, Brennan P, Curado MP; InterCHANGE Group. Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study. *JCO Glob Oncol* 2020;6:486-499.
3. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017;37:163-176.
4. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol* 2012;167:195-205.
5. Aloua R, Kaouani A, Kerdoud O, Salissou I, Slimani F. Melanoma of the oral cavity: A silent killer. *Ann Med Surg (Lond)* 2021;62:182-185.
6. Alves AM, Diel LF, Lamers ML. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med* 2018;47:460-467.
7. Amanzada A, Malik IA, Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, Moriconi F. Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6:561-570.
8. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR, editors. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. Chicago: Springer; 2017.
9. Amit M, Yen TC, Liao CT, Binenbaum Y, Chaturvedi P, Agarwal JP, Kowalski LP, Ebrahimi A, Clark JR, Cernea CR, Brandao SJ, Kreppel M, Zöller J, Fliss D, Bachar G, Shpitzer T, Bolzoni VA, Patel PR, Jonnalagadda S, Robbins KT, Shah JP, Patel SG, Gil Z; International Consortium for Outcome Research (ICOR) in Head and Neck Cancer. Clinical nodal stage is a significant predictor of outcome in patients with oral cavity squamous cell carcinoma and pathologically negative neck metastases: results of the international consortium for outcome research. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3575-3581.

10. Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Nair MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B:63-67.
11. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95:229-249.
12. Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res* 2017;10:1178646917691938.
13. Badawy AA, Guillemin G. The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal. *Int J Tryptophan Res* 2019;12:1178646919868978.
14. Bai J, Gao Z, Li X, Dong L, Han W, Nie J. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget* 2017;8:110693-110707.
15. Bailey CC, DeVaux LB, Farzan M. The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Binds Apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2015;290:26033-26042.
16. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermini LS, Hunt NH. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 2007;396:203-213.
17. Batard P, Szollosi J, Luescher I, Cerottini JC, MacDonald R, Romero P. Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: advantages and limitations. *Cytometry* 2002;48:97-105.
18. Battaglia A, Buzzonetti A, Baranello C, Ferrandina G, Martinelli E, Fanfani F, Scambia G, Fattorossi A. Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumour draining lymph node in patients with early cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1363-1373.
19. Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, Shi JG, Bowman KJ, Scherle PA, Newton RC, Schaub R, Maleski J, Leopold L, Gajewski TF. First-in-Human Phase I Study of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epcadostat (INCB024360) in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clin Cancer Res* 2017;23:3269-3276.
20. Belgiovine C, D'Incalci M, Allavena P, Frapolli R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:2411-2424.
21. Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, Gizzi S, Pallotta MT, Fioretti MC, Grohmann U. Immunosuppression via tryptophan

- catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* 2007;84:S17-20.
22. Ben-Haj-Ayed A, Moussa A, Ghedira R, Gabbouj S, Miled S, Bouzid N, Tebra-Mrad S, Bouaouina N, Chouchane L, Zakhama A, Hassen E. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in nasopharyngeal carcinoma. *Immunol Lett* 2016;169:23-32.
  23. Ben-Kasus T, Schechter B, Sela M, Yarden Y. Cancer therapeutic antibodies come of age: targeting minimal residual disease. *Mol Oncol* 2007;1:42-54.
  24. Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. *J Pathol* 2013;229:186-197.
  25. Bianchin MM, Capella HM, Chaves DL, Steindel M, Grisard EC, Ganev GG, da Silva Júnior JP, Neto Evaldo S, Poffo MA, Walz R, Carlotti Júnior CG, Sakamoto AC. Nasu-Hakola disease (polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy--PLOS): a dementia associated with bone cystic lesions. From clinical to genetic and molecular aspects. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:1-24.
  26. Binnewies M, Pollack JL, Rudolph J, Dash S, Abushawish M, Lee T, Jahchan NS, Canaday P, Lu E, Norng M, Mankikar S, Liu VM, Du X, Chen A, Mehta R, Palmer R, Juric V, Liang L, Baker KP, Reyno L, Krummel MF, Streuli M, Sriram V. Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy. *Cell Rep* 2021;37:109844.
  27. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab* 2012;15:432-437.
  28. Boguszewska K, Szewczuk M, Urbaniak S, Karwowski BT. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:4689-4704.
  29. Bouchon A, Hernández-Munain C, Cella M, Colonna M. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 2001;194:1111-1122.
  30. Braga TT, Agudelo JS, Camara NO. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol* 2015;6:602.
  31. Brandacher G, Cakar F, Winkler C, Schneeberger S, Obrist P, Bösmüller C, Werner-Felmayer G, Werner ER, Bonatti H, Margreiter R, Fuchs D. Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation. *Kidney Int* 2007;71:60-67.

32. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
33. Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA* 1920;74:656-664.
34. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV, Witkiewicz AK. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle* 2009;8:1930-1934.
35. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, Jager MJ. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:643-650.
36. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195:72-79.
37. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, Psyrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fueeder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D; KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;394:1915-1928.
38. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Journal of Immunoassay* 2000;21:165-209.
39. Butowski N, Colman H, De Groot JF, Omuro AM, Nayak L, Wen PY, Cloughesy TF, Marimuthu A, Haidar S, Perry A, Huse J, Phillips J, West BL, Nolop KB, Hsu HH, Ligon KL, Molinaro AM, Prados M. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol* 2016;18:557-564.
40. Calvo E, Moreno V, Flynn M, Holgado E, Olmedo ME, Lopez Criado MP, Kahatt C, Lopez-Vilariño JA, Siguero M, Fernandez-Teruel C, Cullell-Young M, Soto Matos-Pita A, Forster M. Antitumor activity of lurbinectedin (PM01183) and doxorubicin in relapsed small-cell lung cancer: results from a phase I study. *Ann Oncol* 2017;28:2559-2566.

41. Camp R, Charette L, Rimm D. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80:1943-1949.
42. Carlin JM, Ozaki Y, Byrne GI, Brown RR, Borden EC. Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia* 1989;45:535-541.
43. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, Clavero O, Alòs L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimerà N, Lloveras B, León X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Félix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, López-Revilla R, Mandys V, González ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, de Sanjosé S, Xavier Bosch F; ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv403.
44. Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* 2017;357:eaaf9794.
45. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 2014;6:1670-1690.
46. Chaput N, Svrcek M, Aupérin A, Locher C, Drusch F, Malka D, Taïeb J, Goéré D, Ducreux M, Boige V. Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II-III colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109:1013-1022.
47. Chen SH, Hsiao SY, Chang KY, Chang JY. New Insights Into Oral Squamous Cell Carcinoma: From Clinical Aspects to Molecular Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22:2252.
48. Cheng X, Wang X, Nie K, Cheng L, Zhang Z, Hu Y, Peng W. Systematic Pan-Cancer Analysis Identifies TREM2 as an Immunological and Prognostic Biomarker. *Front Immunol* 2021;12:646523.
49. Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, Neyns B, Krysko O, Bachert C, Hennart B, Allorge D, van Geel N, Van Gele M, Brochez L. Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. *Oncoimmunology* 2015;4:e982382.

50. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 2017;97:4-13.
51. Chittechath M, Dhillon MK, Lim JY, Laoui D, Shalova IN, Teo YL, Chen J, Kamaraj R, Raman L, Lum J, Thamboo TP, Chiong E, Zolezzi F, Yang H, Van Ginderachter JA, Poidinger M, Wong AS, Biswas SK. Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity* 2014;41:815-829.
52. Choe JY, Yun JY, Jeon YK, Kim SH, Park G, Huh JR, Oh S, Kim JE. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014;14:335.
53. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* 2013;29:26-34.
54. ClinicalTrials.gov (U.S. National Library of Medicine). Pembrolizumab Plus Epacadostat, Pembrolizumab Monotherapy, and the EXTREME Regimen in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (KEYNOTE-669/ECHO-304). 2022. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03358472> (letzter Zugriff am 13.07.2022).
55. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, Soria A, Machiels JP, Mach N, Mehra R, Burtness B, Zhang P, Cheng J, Swaby RF, Harrington KJ; KEYNOTE-040 investigators. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;393:156-167.
56. Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:201-207.
57. Corm S, Berthon C, Imbenotte M, Biggio V, Lhermitte M, Dupont C, Briche I, Quesnel B. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. *Leuk Res* 2009;33:490-494.
58. Costa V, Kowalski LP, Coutinho-Camillo CM, Begnami MD, Calsavara VF, Neves JI, Kaminagakura E. EGFR amplification and expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2018;47:817-823.

59. Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2013;2:e23428.
60. Dai F, Liu L, Che G, Yu N, Pu Q, Zhang S, Ma J, Ma L, You Z. The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010;10:220.
61. Dal Maso L, Torelli N, Biancotto E, Di Maso M, Gini A, Franchin G, Levi F, La Vecchia C, Serraino D, Polesel J. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur J Epidemiol* 2016;31:385-393.
62. Dammeijer F, Lievens LA, Kaijen-Lambers ME, van Nimwegen M, Bezemer K, Hegmans JP, van Hall T, Hendriks RW, Aerts JG. Depletion of Tumor-Associated Macrophages with a CSF-1R Kinase Inhibitor Enhances Antitumor Immunity and Survival Induced by DC Immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2017;5:535-546.
63. Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, Matter C, von Boehmer L, Cecconi V, Hermanns T, Hefermehl L, Schraml P, Moch H, Knuth A, van den Broek M. Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2013;2:e23562.
64. Daud A, Saleh M, Hu J, Bleeker J, Riese M, Meier R, Zhou L, Serbest G, Lewis Karl. Epcadostat plus nivolumab for advanced melanoma: Updated phase 2 results of the ECHO-204 study. *J of Clin Oncol* 2018;36:9511.
65. Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, Chen TT, Tchao NK, Seaman WE. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J Immunol* 2003;171:594-599.
66. De Paz D, Young CK, Chien HT, Tsao CK, Fok CC, Fan KH, Liao CT, Wang HM, Kang CJ, Chang JT, Huang SF. Prognostic Roles of SCC Antigen, CRP and CYFRA 21-1 in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2019;39:2025-2033.
67. De Zinis LO, Bolzoni A, Piazza C, Nicolai P. Prevalence and localization of nodal metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity: role and extension of neck dissection. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:1131-1135.
68. Del Rosario RN, Barr RJ, Jensen JL, Cantos KA. Basal cell carcinoma of the buccal mucosa. *Am J Dermatopathol* 2001;23:203-205.
69. Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* 2010;48:385-407.

70. Di Caro G, Cortese N, Castino GF, Grizzi F, Gavazzi F, Ridolfi C, Capretti G, Mineri R, Todoric J, Zerbi A, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy. *Gut* 2016;65:1710-1720.
71. Dittrich W, Göhde W: Patent DE1815352: FLOW-THROUGH CHAMBER FOR PHOTOMETERS TO MEASURE AND COUNT PARTICLES IN A DISPERSION MEDIUM. Angemeldet am 18.12.1968
72. Efendioğlu M, Şanlı E, Türkoğlu C, Balak N. Reduced Serum sRANKL and sTREM2 Levels in High-Grade Gliomas: Association with Prognosis. *Noro Psikiyatr Ars* 2021;58:133-136.
73. Engin A, Gonul II, Engin AB, Karamercan A, Dincel AS, Dursun A. Relationship between indoleamine 2,3-dioxygenase activity and lymphatic invasion propensity of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016;22:3592e601.
74. Engin AB, Ozkan Y, Fuchs D, Yardim-Akaydin S. Increased tryptophan degradation in patients with bronchus carcinoma. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2010;19:803-808.
75. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 2010;56:319-320.
76. Esparza-Baquer A, Labiano I, Sharif O, Agirre-Lizaso A, Oakley F, Rodrigues PM, Zhuravleva E, O'Rourke CJ, Hijona E, Jimenez-Agüero R, Riaño I, Landa A, La Casta A, Zaki MYW, Munoz-Garrido P, Azkargorta M, Elortza F, Vogel A, Schabbauer G, Aspichueta P, Andersen JB, Knapp S, Mann DA, Bujanda L, Banales JM, Perugorria MJ. TREM-2 defends the liver against hepatocellular carcinoma through multifactorial protective mechanisms. *Gut* 2021;70:1345-1361.
77. Ezekowitz RA, Gordon S. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemp Top Immunobiol* 1984;13:33-56.
78. Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005;210:153-160.
79. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Fioretti MC, Puccetti P. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2006;17:58-60.
80. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The

- combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006;176:6752-6761.
81. Fan W, Yang X, Huang F, Tong X, Zhu L, Wang S. Identification of CD206 as a potential biomarker of cancer stem-like cells and therapeutic agent in liver cancer. *Oncol Lett.* 2019;18:3218-3226.
  82. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, Klasa R, Voss N, Connors JM, Gascoyne RD. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 2005;106:2169-2174.
  83. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144:1941-1953.
  84. Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology* 2015;4.
  85. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016;375:1856-1867.
  86. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:2091-2098.
  87. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1472-1479.
  88. Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C (2003) Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63:1179-1182.
  89. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, Antonia SJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 2002;101:151-155.

90. Friedlander PL. Genomic instability in head and neck cancer patients. *Head Neck* 2001;23:683-691.
91. Gao L, Zhang W, Zhong WQ, Liu ZJ, Li HM, Yu ZL, Zhao YF. Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2018;4:2558-2572.
92. Gonçalves AS, Costa NL, Arantes DA, de Cássia Gonçalves Alencar R, Silva TA, Batista AC. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2013;42:535-540.
93. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peucker A, Müller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008;67:453-463.
94. Gould CM, Courtneidge SA. Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment. *Cell Adh Migr* 2014;8:226-235.
95. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370:59-67.
96. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JS, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J; Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013;368:117-127.
97. Gupta AA, Kheur S, Varadarajan S, Parveen S, Dewan H, Alhazmi YA, Raj TA, Testarelli L, Patil S. Chronic mechanical irritation and oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Bosn J Basic Med Sci* 2021;21:647-658.
98. Hakim SG, von Bialy R, Falougy M, Steller D, Tharun L, Rades D, Sieg P, Alsharif U. Impact of stratified resection margin classification on local tumor control and survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2021;124:1284-1295.
99. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 2000;7:263-269.

100. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:948098.
101. Haque ASMR, Moriyama M, Kubota K, Ishiguro N, Sakamoto M, Chinju A, Mochizuki K, Sakamoto T, Kaneko N, Munemura R, Maehara T, Tanaka A, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S. CD206<sup>+</sup> tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. *Sci Rep* 2019;9:14611.
102. Hascitha J, Priya R, Jayavelu S, Dhandapani H, Selvaluxmy G, Sunder Singh S, Rajkumar T. Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients. *Clin Biochem* 2016;49:919-924.
103. Hashim D, Sartori S, Brennan P, Curado MP, Wünsch-Filho V, Divaris K, Olshan AF, Zevallos JP, Winn DM, Franceschi S, Castellsagué X, Lissowska J, Rudnai P, Matsuo K, Morgenstern H, Chen C, Vaughan TL, Hofmann JN, D'Souza G, Haddad RI, Wu H, Lee YC, Hashibe M, Vecchia CL, Boffetta P. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Ann Oncol* 2016;27:1619-1625.
104. He KF, Zhang L, Huang CF, Ma SR, Wang YF, Wang WM, Zhao ZL, Liu B, Zhao YF, Zhang WF, Sun ZJ. CD163<sup>+</sup> tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res In* 2014;2014:838632.
105. Hebert JR, Gupta PC, Bhonsle RB, Mehta H, Zheng W, Sanderson M, Teas J. Dietary exposures and oral precancerous lesions in Srikakulam District, Andhra Pradesh, India. *Public Health Nutr* 2002;5:303-312.
106. Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, Chen B, Qin J, Filippa DA, Nimer SD, Teruya-Feldstein J. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2002;33:968-974.
107. Heeren AM, van Dijk I, Berry DRAI, Khelil M, Ferns D, Kole J, Musters RJP, Thijssen VL, Mom CH, Kenter GG, Bleeker MCG, de Gruijl TD, Jordanova ES. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression Pattern in the Tumor Microenvironment Predicts Clinical Outcome in Early Stage Cervical Cancer. *Front Immunol* 2018;9:1598.
108. Henze AT, Mazzone M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* 2016;126:3672-3679.

109. Herrera-Rios D, Mughal SS, Teuber-Hanselmann S, Pierscianek D, Sucker A, Jansen P, Schimming T, Klode J, Reifenberger J, Felsberg J, Keyvani K, Brors B, Sure U, Reifenberger G, Schadendorf D, Helfrich I. Macrophages/Microglia Represent the Major Source of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Melanoma Metastases of the Brain. *Front Immunol* 2020;11:120.
110. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012;180:1340-1355.
111. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993;81:1607-1613.
112. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1245-1251.
113. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 2007;67:792-801.
114. Huang A, Fuchs D, Widner B, Glover C, Henderson DC, Allen-Mersh TG. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1691-1696.
115. Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999;17:259-269.
116. Hulspas R, O'Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:355-364.
117. Imai R, Takenaka Y, Yasui T, Nakahara S, Yamamoto Y, Hanamoto A, Takemoto N, Fukusumi T, Cho H, Yamamoto M, Inohara H. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in patients with head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2015;135:295-301.
118. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, Nagasaka T, Akimoto H, Takikawa O, Kikkawa F. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2009;115:185-192.

119. Ingalls RR, Golenbock DT. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995;181:1473-1479.
120. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Miyazono F, Hokita S, Aikou T. Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 2000;23:4079-4083.
121. Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:319-326.
122. Ito H, Hamerman JA. TREM-2, triggering receptor expressed on myeloid cell-2, negatively regulates TLR responses in dendritic cells. *Eur J Immunol* 2012;42:176-185.
123. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow cytometry. *J Invest Dermatol* 2012;132:1-6.
124. Jahchan NS, Mujal AM, Pollack JL, Binnewies M, Sriram V, Reyno L, Krummel MF. Tuning the Tumor Myeloid Microenvironment to Fight Cancer. *Front Immunol* 2019;10:1611.
125. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, Mellor AL, Munn DH, Blazar BR. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2008;111:3257-3265.
126. Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE. TREM2 in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 2017;12:56.
127. 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.
128. Jaynes JM, Sable R, Ronzetti M, Bautista W, Knotts Z, Abisoye-Ogunniyan A, Li D, Calvo R, Dashnyam M, Singh A, Guerin T, White J, Ravichandran S, Kumar P, Talsania K, Chen V, Ghebremedhin A, Karanam B, Bin Salam A, Amin R, Odzorig T, Aiken T, Nguyen V, Bian Y, Zarif JC, de Groot AE, Mehta M, Fan L, Hu X, Simeonov A, Pate N, Abu-Asab M, Ferrer M, Southall N, Ock CY, Zhao Y, Lopez H, Kozlov S, de Val N, Yates CC, Baljinnyam B, Marugan J, Rudloff U. Mannose receptor (CD206) activation in tumor-associated macrophages enhances adaptive and innate antitumor immune responses. *Sci Transl Med* 2020;12:eaax6337.

129. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
130. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 2018;118:9-16.
131. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 2014;17:109-118.
132. Jha GG, Gupta S, Tagawa ST, Koopmeiners JS, Vivek S, Dudek AZ, Cooley SA, Blazar BR, Miller JS. A phase II randomized, double-blind study of sipuleucel-T followed by IDO pathway inhibitor, indoximod, or placebo in the treatment of patients with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *J Clin Oncol* 2017;35:3066.
133. Jin SC, Benitez BA, Karch CM, Cooper B, Skorupa T, Carrell D, Norton JB, Hsu S, Harari O, Cai Y, Bertelsen S, Goate AM, Cruchaga C. Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2014;23:5838-5846.
134. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:92.
135. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:657-662.
136. Karthaus N, Torensma R, Tel J. Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *Am J Pathol* 2012;181:733-742.
137. Khantakova D, Brioschi S, Molgora M. Exploring the Impact of TREM2 in Tumor-Associated Macrophages. *Vaccines (Basel)* 2022;10:943.
138. Kleinberger G, Yamanishi Y, Suárez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, Struyfs H, Pettkus N, Wenninger-Weinzierl A, Mazaheri F, Tahirovic S, Lleó A, Alcolea D, Fortea J, Willem M, Lammich S, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R, Antonell A, Ramirez A, Heneka MT, Slegers K, van der Zee J, Martin JJ, Engelborghs S, Demirtas-Tatlidede A, Zetterberg H, Van Broeckhoven C, Gurvit H, Wyss-Coray T, Hardy J, Colonna M, Haass C. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* 2014;6:243ra86.
139. Kohl TO, Ascoli CA. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc* 2017;2017:pdb.prot093740.

140. Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2017;2017:pdb.prot093724.
141. Kondoh N, Mizuno-Kamiya M, Umemura N, Takayama E, Kawaki H, Mitsudo K, Muramatsu Y, Sumitomo S. Immunomodulatory aspects in the progression and treatment of oral malignancy. *Jpn Dent Sci Rev* 2019;55:113-120.
142. van der Kooij MA, von der Mark EM, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJ, Morand OH. Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3107-3116.
143. Kong LQ, Zhu XD, Xu HX, Zhang JB, Lu L, Wang WQ, Zhang QB, Wu WZ, Wang L, Fan J, Tang ZY, Sun HC. The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e59771.
144. Kotake Y, Masayama I. The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan. *Z Physiol Chem* 1936;243:237-244.
145. Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976;92:571-577.
146. Kühn JP, Schmid W, Körner S, Bochen F, Wemmert S, Rimbach H, Smola S, Radosa JC, Wagner M, Morris LGT, Bozzato V, Bozzato A, Schick B, Linxweiler M. HPV status as prognostic biomarker in head and neck cancer-which method fits the best for outcome prediction? *Cancers* 2021;13:4730.
147. 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.
148. Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2011;167:e211-e219.
149. Kurokawa H, Yamashita Y, Tokudome S, Kajiyama M. Combination assay for tumor markers in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:964-966.
150. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated

- macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 2009;183:6469-6477.
151. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:106-112.
152. Laimer J, Lauinger A, Steinmassl O, Offermanns V, Grams AE, Zelger B, Bruckmoser E. Cervical Lymph Node Metastases in Oral Squamous Cell Carcinoma-How Much Imaging Do We Need? *Diagnostics (Basel)* 2020;10:199.
153. Laimer K, Troester B, Kloss F, Schafer G, Obrist P, Perathoner A, Laimer J, Brandacher G, Rasse M, Margreiter R, Amberger A. Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2011;47:352-357.
154. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, Wong F, Azad NS, Rucki AA, Laheru D, Donehower R, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Greten TF, Duffy AG, Ciombor KK, Eyring AD, Lam BH, Joe A, Kang SP, Holdhoff M, Danilova L, Cope L, Meyer C, Zhou S, Goldberg RM, Armstrong DK, Bever KM, Fader AN, Taube J, Housseau F, Spetzler D, Xiao N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Eshleman JR, Vogelstein B, Anders RA, Diaz LA Jr. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357:409-413.
155. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4625-4629.
156. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. Leitlinie Mundhöhlenkarzinom „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. 2021. Verfügbar unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion\\_.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion_.pdf) (letzter Zugriff am 23.07.2022).
157. Li Y, Huang G, Zhang S. Associations between intratumoral and peritumoral M2 macrophage counts and cervical squamous cell carcinoma invasion patterns. *Int J Gynaecol Obstet* 2017;139:346-351.
158. Liang XJ, Chen C, Zhao Y, Wang PC. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. *Methods Mol Biol* 2010;596:467-488.

159. Ligasová A, Koberna K. DNA Dyes-Highly Sensitive Reporters of Cell Quantification: Comparison with Other Cell Quantification Methods. *Molecules* 2021;26:5515.
160. Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenpus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B. Combination of p16(INK4a)/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol* 2015;123:219-229.
161. Liu JC, Bhayani M, Kuchta K, Galloway T, Fundakowski C. Patterns of distant metastasis in head and neck cancer at presentation: Implications for initial evaluation. *Oral Oncol* 2019;88:131-136.
162. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, Leffet L, Hansbury MJ, Thomas B, Rupar M, Waeltz P, Bowman KJ, Polam P, Sparks RB, Yue EW, Li Y, Wynn R, Fridman JS, Burn TC, Combs AP, Newton RC, Scherle PA. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 2010;115:3520-3530.
163. Lue LF, Schmitz C, Walker DG. What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: immunoregulatory turned into immunopathogenic? *Neuroscience* 2015;302:138-150.
164. Ma LZ, Tan L, Bi YL, Shen XN, Xu W, Ma YH, Li HQ, Dong Q, Yu JT. Dynamic changes of CSF sTREM2 in preclinical Alzheimer's disease: the CABLE study. *Mol Neurodegener* 2020;15:25.
165. Mabuchi R, Hara T, Matsumoto T, Shibata Y, Nakamura N, Nakamura H, Kitagawa J, Kanemura N, Goto N, Shimizu M, Ito H, Yamamoto Y, Saito K, Moriwaki H, Tsurumi H. High serum concentration of L-kynurenine predicts unfavorable outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2016;57:92-98.
166. MacFarlane AW 4th, Jillab M, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, Dulaimi E, Al-Saleem T, Campbell KS. PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol Res* 2014;2:320-331.
167. Mandarano M, Orecchini E, Bellezza G, Vannucci J, Ludovini V, Baglivo S, Tofanetti FR, Chiari R, Loreti E, Puma F, Sidoni A, Belladonna ML. Kynurenine/Tryptophan Ratio as a Potential Blood-Based Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22:4403.
168. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013;229:176-185.

169. Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2015;6:208-223.
170. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181-273.
171. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6:13.
172. Martins F, Sofiya L, Sykiotis GP, Lamine F, Maillard M, Fraga M, Shabafrouz K, Ribi C, Cairoli A, Guex-Crosier Y, Kuntzer T, Michielin O, Peters S, Coukos G, Spertini F, Thompson JA, Obeid M. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:563-580.
173. Masaki A, Ishida T, Maeda Y, Suzuki S, Ito A, Takino H, Ogura H, Totani H, Yoshida T, Kinoshita S, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Inagaki A, Komatsu H, Niimi A, Ueda R, Utsunomiya A, Inagaki H, Iida S. Prognostic Significance of Tryptophan Catabolism in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:2830-2839.
174. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:67-76.
175. Matko J, Edidin M. Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces. *Methods Enzymol* 1997;278:444-462.
176. Mazaheri F, Snaidero N, Kleinberger G, Madore C, Daria A, Werner G, Krasemann S, Capell A, Trümbach D, Wurst W, Brunner B, Bultmann S, Tahirovic S, Kerschensteiner M, Misgeld T, Butovsky O, Haass C. TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep* 2017;18:1186-1198.
177. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2018;120:5.1.1-5.1.11.
178. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, Silva CAB, Warnakulasuriya S, Rivero ERC. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2019;23:2849-2859.
179. Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the

- antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res* 2007;67:7082-2087.
180. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 2010;185:3190-3198.
181. Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, Nelson D, Laramore G, Pilepich M. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol* 2002;15:1366-13673.
182. Mitchell TC, Hamid O, Smith DC, Bauer TM, Wasser JS, Olszanski AJ, Luke JJ, Balmanoukian AS, Schmidt EV, Zhao Y, Gong X, Maleski J, Leopold L, Gajewski TF. Epcadostat Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Solid Tumors: Phase I Results From a Multicenter, Open-Label Phase I/II Trial (ECHO-202/KEYNOTE-037). *J Clin Oncol* 2018;36:3223-3230.
183. Mobley JL, Leininger M, Madore S, Baginski TJ, Renkiewicz R. Genetic evidence of a functional monocyte dichotomy. *Inflammation* 2007;30:189-197.
184. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 2001;8:14-20.
185. Molgora M, Esaulova E, Vermi W, Hou J, Chen Y, Luo J, Brioschi S, Bugatti M, Omodei AS, Ricci B, Fronick C, Panda SK, Takeuchi Y, Gubin MM, Faccio R, Cella M, Gilfillan S, Unanue ER, Artyomov MN, Schreiber RD, Colonna M. TREM2 Modulation Remodels the Tumor Myeloid Landscape Enhancing Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* 2020;182:886-900.e17.
186. Moratin J, Metzger K, Safaltin A, Herpel E, Hoffmann J, Freier K, Hess J, Horn D. Upregulation of PD-L1 and PD-L2 in neck node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2019;41:2484-2491.
187. Mroueh R, Nevala A, Haapaniemi A, Pitkäniemi J, Salo T, Mäkitie AA. Risk of second primary cancer in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2020;42:1848-1858.
188. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005;11:312-319.

189. Muller AJ, Manfredi MG, Zakharia Y, Prendergast GC. Inhibiting IDO pathways to treat cancer: lessons from the ECHO-301 trial and beyond. *Semin Immunopathol* 2019;41:41-48.
190. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007;117:1147-1154.
191. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999;189:1363-1372.
192. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005;22:633-642.
193. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100-4110.
194. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-1193.
195. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-737.
196. Musajo L, Benassi CA. Aspects of disorders of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in man. *Adv Clin Chem* 1964;19:63-135.
197. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitar M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001;194:349-357.
198. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001;94:1-5.
199. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, Toriola AT, Nieman RK, Worley LA, Yano M, Fowler KJ, Lockhart AC, Suresh R, Tan BR, Lim KH, Fields RC, Strasberg SM, Hawkins WG, DeNardo DG, Goedegebuure SP, Linehan DC. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally

- advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016;17:651-662.
200. Okubo M, Kioi M, Nakashim H., Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, Taniguchi H, Tohnai I. M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Sci Rep* 2016;6:27548.
201. Okura M, Aikawa T, Sawai NY, Iida S, Kogo M. Decision analysis and treatment threshold in a management for the N0 neck of the oral cavity carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:908-911.
202. Olmos M, Glajzer J, Büntemeyer TO, Frohwitter G, Ries J, Eckstein M, Hecht M, Lutz R, Kesting MR, Weber M. Neoadjuvant Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Case Report and Assessment of Histological Response. *Front Oncol* 2021;11:720951.
203. Opitz CA, Litzemberger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011;478:197-203.
204. Paloneva J, Manninen T, Christman G, Hovanes K, Mandelin J, Adolfsson R, Bianchin M, Bird T, Miranda R, Salmaggi A, Tranebjaerg L, Konttinen Y, Peltonen L. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2002;71:656-662.
205. Pandey M, Thomas G, Mathew A, Abraham EK, Somanathan T, Ramadas K, Iype EM, Ahamed IM, Sebastian P, Nair MK. Sarcoma of the oral and maxillofacial soft tissue in adults. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:145-148.
206. Pantano F, Berti P, Guida FM, Perrone G, Vincenzi B, Amato MM, Righi D, Dell'aquila E, Graziano F, Catalano V, Caricato M, Rizzo S, Muda AO, Russo A, Tonini G, Santini D. The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients. *J Cell Mol Med* 2013;17:1415-1421.
207. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Canc* 2012;12:252-264.
208. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019;18:63.

209. Petersen LØ, Jensen JS, Jakobsen KK, Grønhøj C, Wessel I, von Buchwald C. Second primary cancer following primary oral squamous cell carcinoma: a population-based, retrospective study. *Acta Oncol* 2022;5:1-6.
210. Petruzzi MN, Cherubini K, Salum FG, de Figueiredo MA. Role of tumour-associated macrophages in oral squamous cells carcinoma progression: an update on current knowledge. *Diagn Pathol* 2017;12:32.
211. Piccio L, Buonsanti C, Cella M, Tassi I, Schmidt RE, Fenoglio C, Rinker J 2nd, Naismith RT, Panina-Bordignon P, Passini N, Galimberti D, Scarpini E, Colonna M, Cross AH. Identification of soluble TREM-2 in the cerebrospinal fluid and its association with multiple sclerosis and CNS inflammation. *Brain* 2008;13:3081-3091.
212. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 2012;64:109-130.
213. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000;355:949-955.
214. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 2009;25:30-38.
215. Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003244.
216. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol* 2015;27:237-248.
217. Postigo AA, Corbí AL, Sánchez-Madrid F, de Landázuri MO. Regulated expression and function of CD11c/CD18 integrin on human B lymphocytes. Relation between attachment to fibrinogen and triggering of proliferation through CD11c/CD18. *J Exp Med* 1991;174:1313-1322.
218. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:817-823.
219. Pulford KA, Sipos A, Cordell JL, Stross WP, Mason DY. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* 1990;2:973-980.
220. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39-51.

221. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19:1423-1437.
222. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 1987;8:138-140.
223. Riesenberg R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz RA, Stief CG, Hofstetter A, Zimmermann W. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6993-7002.
224. Robert Koch-Institut: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD). Krebs in Deutschland 2017/2018. 2021. Verfügbar unter: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c00\\_c14\\_mundhoehle\\_rachen.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c00_c14_mundhoehle_rachen.pdf?__blob=publicationFile) (letzter Zugriff am 29.09.2022).
225. Rudhart SA, Gehrt F, Birk R, Schultz JD, Stankovic P, Georgiew R, Wilhelm T, Stuck BA, Hoch S. Clinical relevance of CYFRA 21-1 as a tumour marker in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020;277:2561-2571.
226. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 2012;33:119-126.
227. Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Res* 1954;14:119-123.
228. Saito N, Pulford KA, Breton-Gorius J, Masse JM, Mason DY, Cramer EM. Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol* 1991;139:1053-1059.
229. Salmi S, Siiskonen H, Sironen R, Tyynelä-Korhonen K, Hirschovits-Gerz B, Valkonen M, Auvinen P, Pasonen-Seppänen S. The number and localization of CD68+ and CD163+ macrophages in different stages of cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2019;29:237-247.
230. Schlepckow K, Monroe KM, Kleinberger G, Cantuti-Castelvetri L, Parhizkar S, Xia D, Willem M, Werner G, Pettkus N, Brunner B, Sülzen A, Nuscher B, Hampel H, Xiang X, Feederle R, Tahirovic S, Park JI, Prorok R, Mahon C, Liang CC, Shi J, Kim DJ, Sabelström H, Huang F, Di Paolo G, Simons M, Lewcock JW, Haass C. Enhancing

- protective microglial activities with a dual function TREM2 antibody to the stalk region. *EMBO Mol Med* 2020;12:e11227.
231. Schmidt SV, Schultze JL. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front Immunol* 2014;5:384.
232. Scott GN, DuHadaway J, Pigott E, Ridge N, Prendergast GC, Muller AJ, Mandik-Nayak L. The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 2009;182:7509-7517.
233. Seppälä M, Halme E, Tiilikainen L, Luukkainen A, Laranne J, Rautiainen M, Huhtala H, Paavonen T, Toppila-Salmi S. The expression and prognostic relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2016;136:729-735.
234. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)* 2016;77:C98-101.
235. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018;233:6425-6440.
236. Sharma JD, Baishya N, Kataki AC, Kalita CR, Das AK, Rahman T. Head and neck squamous cell carcinoma in young adults: A hospital-based study. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2019;40:18-22.
237. Shen XN, Niu LD, Wang YJ, Cao XP, Liu Q, Tan L, Zhang C, Yu JT. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:590-598.
238. Sherman SE, Gibson D, Wang AH-J, Lippard SJ. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(pGpG)}]. *Science* 1985;230:412-417.
239. Shigeoka M, Koma YI, Nishio M, Komori T, Yokozaki H. CD163<sup>+</sup> macrophages infiltration correlates with the immunosuppressive cytokine interleukin 10 expression in tongue leukoplakia. *Clin Exp Dent Res* 2019;5:627-637.
240. Silva TD, Ferreira CB, Leite GB, de Menezes Pontes JR, Antunes HS. Oral manifestations of lymphoma: a systematic review. *Ecancermedicalscience* 2016;10:665.

241. Slieker FJB, Rombout DAA, de Bree R, Van Cann EM. Local recurrence and survival after treatment of oral squamous cell carcinoma of the maxilla: A systematic review and meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2022;133:626-638.
242. Soliman HH, Minton SE, Han HS, Ismail-Khan R, Neuger A, Khambati F, NoJa D, Lush R, Chiappori AA, Roberts JD, Link C, Vahanian NN, Mautino M, Streicher H, Sullivan DM, Antonia SJ. A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 2016;7:22928-22938.
243. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86:1065-1073.
244. Song W, Hooli B, Mullin K, Jin SC, Cella M, Ulland TK, Wang Y, Tanzi RE, Colonna M. Alzheimer's disease-associated TREM2 variants exhibit either decreased or increased ligand-dependent activation. *Alzheimers Dement* 2017;13:381-387.
245. Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspeslagh M, van Gele M, Thielemans K, Neyns B, Roche N, Verbeke N, Deron P, Speeckaert M, Brochez L. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer* 2012;48:2004-2011.
246. Sperner-Unterweger B, Neurauter G, Klieber M, Kurz K, Meraner V, Zeimet A, Fuchs D. Enhanced tryptophan degradation in patients with ovarian carcinoma correlates with several serum soluble immune activation markers. *Immunobiology* 2011;216:296-301.
247. Squadrito ML, De Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2011;32:123-145.
248. Suárez-Calvet M, Kleinberger G, Araque Caballero MÁ, Brendel M, Rominger A, Alcolea D, Fortea J, Lleó A, Blesa R, Gispert JD, Sánchez-Valle R, Antonell A, Rami L, Molinuevo JL, Brosseron F, Trschütz A, Heneka MT, Struyfs H, Engelborghs S, Sleegers K, Van Broeckhoven C, Zetterberg H, Nellgård B, Blennow K, Crispin A, Ewers M, Haass C. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol Med* 2016;8:466-476.
249. Sucić M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanović M, Drobňak M, Zalud I, Marusić M. Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leukocyte populations. *Cytometry* 1989;10:442-447.

250. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg* 2018;46:177-182.
251. Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Suzuki M, Fujie M, Hahimoto D, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer* 2010;67:361-365.
252. Szykowska A, Chen Y, Smith TB, Preger C, Yang J, Qian D, Mukhopadhyay SM, Wigren E, Neame SJ, Gräslund S, Persson H, Atkinson PJ, Di Daniel E, Mead E, Wang J, Davis JB, Burgess-Brown NA, Bullock AN. Selection and structural characterization of anti-TREM2 scFvs that reduce levels of shed ectodomain. *Structure* 2021;29:1241-1252.e5.
253. Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 2005;201:647-657.
254. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong K, Bescher N, Mourcin F, Uhel F, Le Tulzo Y, Tarte K. Enhanced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;201:956-966.
255. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 1991;5:2516-2522.
256. Théate I, van Baren N, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renauld JC, Hervé C, Gutierrez-Roelens I, Marbaix E, Sempoux C, Van den Eynde BJ. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res* 2015;3:161-172.
257. Thomas DM, Zalcborg JR. 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 1998;25:887-895.
258. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012;65:87-108.
259. Tracy BP, Gaida SM, Papoutsakis ET. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:85-99.
260. Travassos DC, Fernandes D, Massucato EMS, Navarro CM, Bufalino A. Squamous cell carcinoma antigen as a prognostic marker and its correlation with clinicopathological features in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med* 2018;47:3-10.

261. Tripathi C, Tewari BN, Kanchan RK, Baghel KS, Nautiyal N, Shrivastava R, Kaur H, Bhatt ML, Bhadauria S. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a pro-angiogenic M2-polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. *Oncotarget*. 2014;5:5350-5368.
262. Tundup S, Srivastava L, Harn DA Jr. Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253:E1-E13.
263. Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 2006;177:3520-3524.
264. Twomey, J.D., Zhang, B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J* 2021;23:39.
265. U.S. Food and Drug Administration. 2006. Verfügbar unter: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/ood/detailedIndex.cfm?cfgridkey=132700> (letzter Zugriff am 03.08.2022).
266. U.S. Food and Drug Administration. 2011. Verfügbar unter: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/applletter/2011/125084s153ltr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2011/125084s153ltr.pdf) (letzter Zugriff am 03.08.2022).
267. U.S. Food and Drug Administration. Nivolumab for SCCHN. 2016. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/nivolumab-scchn> (letzter Zugriff am 13.07.2022).
268. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves pembrolizumab for first-line treatment of head and neck squamous cell carcinoma. 2016. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-first-line-treatment-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma> (letzter Zugriff am 13.07.2022).
269. U.S. Food and Drug Administration. pembrolizumab (KEYTRUDA). 2016. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/pembrolizumab-keytruda> (letzter Zugriff am 13.07.2022).
270. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9:1269-1274.
271. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De

- Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1116-1127.
272. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014;26:123-141.
273. Wang XQ, Tao BB, Li B, Wang XH, Zhang WC, Wan L, Hua XM, Li ST. Overexpression of TREM2 enhances glioma cell proliferation and invasion: a therapeutic target in human glioma. *Oncotarget*. 2016;7:2354-2366.
274. Weber M, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Distel L, Ries J, Amann K, Neukam FW, Wehrhan F. Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages--an immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42:1087-1094.
275. Weber M, Iliopoulos C, Moebius P, Büttner-Herold M, Amann K, Ries J, Preidl R, Neukam FW, Wehrhan F. Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2016;52:75-84.
276. Weber M, Wehrhan F, Baran C, Agaimy A, Büttner-Herold M, Öztürk H, Neubauer K, Wickenhauser C, Kesting M, Ries J. Malignant transformation of oral leukoplakia is associated with macrophage polarization. *J Transl Med* 2020;18:11.
277. Wehrhan F, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Preidl R, Distel L, Ries J, Amann K, Schmitt C, Neukam FW, Weber M. Increased malignancy of oral squamous cell carcinomas (oscc) is associated with macrophage polarization in regional lymph nodes - an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2014;14:522.
278. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology* 2007;214:8e14.
279. Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8959-8967.
280. Wolfer S, Kunzler A, Foos T, Ernst C, Leha A, Schultze-Mosgau S. Gender and risk-taking behaviors influence the clinical presentation of oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dent Res* 2022;8:141-151.
281. Wu J, Guo Q, Zhang G, Zhao L, Lv Y, Wang J, Liu J, Shi W. Study on the targeted therapy of oral squamous cell carcinoma with a plasmid expressing PE38KDEL toxin under control of the SERPINB3 promoter. *Cancer Med* 2020;9:2213-2222.

282. Wu K, Byers DE, Jin X, Agapov E, Alexander-Brett J, Patel AC, Cella M, Gilfilan S, Colonna M, Kober DL, Brett TJ, Holtzman MJ. TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection. *J Exp Med* 2015;212:681-697.
283. Xing J, Titus AR, Humphrey MB. The TREM2-DAP12 signaling pathway in Nasu-Hakola disease: a molecular genetics perspective. *Res Rep Biochem* 2015;5:89-100.
284. Xiong D, Wang Y, You M. A Gene Expression Signature of TREM2(hi) Macrophages and Gammadelta T Cells Predicts Immunotherapy Response. *Nat Commun* 2020;11:5084.
285. Yamamoto S, Hayaishi O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem* 1967;242:5260-5266.
286. Ye J, Liu H, Hu Y, Li P, Zhang G, Li Y. Tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts poor outcome in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2013;462:73-81.
287. Yoshikawa T, Hara T, Tsurumi H, Goto N, Hoshi M, Kitagawa J, Kanemura N, Kasahara S, Ito H, Takemura M, Saito K, Seishima M, Takami T, Moriwaki H. Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol* 2010;84:304-309.
288. Yuen PWA, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, Yuen WF, Wei WI. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck* 2002;24:513-520.
289. Zain RB, Ikeda N, Gupta PC, Warnakulasuriya S, van Wyk CW, Shrestha P, Axéll T. Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits. *J Oral Pathol Med* 1999;28:1-4.
290. Zakharia Y, McWilliams RR, Rixe O, Drabick J, Shaheen MF, Grossmann KF, Kolhe R, Pacholczyk R, Sadek R, Tennant LL, Smith CM, Kennedy EP, Link CJ Jr, Vahanian NN, Yu J, Shen SS, Brincks EL, Rossi GR, Munn D, Milhem M. Phase II trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus pembrolizumab for the treatment of patients with advanced melanoma. *J Immunother Cancer* 2021;9:e002057.
291. Zhang H, Sheng L, Tao J, Chen R, Li Y, Sun Z, Qian W. Depletion of the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 inhibits progression of renal cell carcinoma via regulating related protein expression and PTEN-PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol* 2016;49:2498-2506.

292. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, Di W. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res* 2014;7:19.
293. Zhang X, Wang W, Li P, Wang X, Ni K. High TREM2 expression correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Hum Pathol* 2018;72:91-99.
294. Zhao C, Zhang H, Wong WC, Sem X, Han H, Ong SM, et al. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J Proteome Res* 2009;8:4028-4038.
295. Zheng Q, Gan G, Gao X, Luo Q, Chen F. Targeting the IDO-BCL2A1-Cytochrome c Pathway Promotes Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Onco Targets Ther* 2021;14:1673-1687.
296. Zhong L, Chen XF, Wang T, Wang Z, Liao C, Wang Z, Huang R, Wang D, Li X, Wu L, Jia L, Zheng H, Painter M, Atagi Y, Liu CC, Zhang YW, Fryer JD, Xu H, Bu G. Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. *J Exp Med* 2017;214:597-607.
297. Zhong L, Chen XF. The Emerging Roles and Therapeutic Potential of Soluble TREM2 in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2019;11:328.
298. Zhou QH, Han H, Lu JB, Liu TY, Huang KB, Deng CZ, Li ZS, Chen JP, Yao K, Qin ZK, Liu ZW, Li YH, Guo SJ, Ye YL, Zhou FJ, Liu RY. Up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) expression and catalytic activity is associated with immunosuppression and poor prognosis in penile squamous cell carcinoma patients. *Cancer Commun (Lond)* 2020;40:3-15.
299. Zittel S, Moratin J, Horn D, Metzger K, Ristow O, Engel M, Mrosek J, Freier K, Hoffmann J, Freudlsperger C. Clinical outcome and prognostic factors in recurrent oral squamous cell carcinoma after primary surgical treatment: a retrospective study. *Clin Oral Investig* 2022;26:2055-2064.

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Ablauf der Ficoll-Isolierung der peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). 48
- Abbildung 2:** Zellpopulationen der peripheral blood mononuclear cells bei der durchflusszytometrischen Messung in Abhängigkeit von ihrer Zellgröße (FSC-A) und Granularität (SSC-A). 51
- Abbildung 3:** Darstellung der Exzitations- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome der Panel (A) IDO1 (A) und (B) TREM2. 52
- Abbildung 4:** Ablauf eines sandwich-enzyme-linked immunosorbent assays (Sandwich-ELISAs). 56
- Abbildung 5:** Ablauf eines kompetitiven enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). 57
- Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung einer (A) niedrigen, (B) mittleren und (C) hohen IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen (D-E). 62
- Abbildung 7:** Exemplarische Darstellung einer (A) niedrigen, (B) mittleren und (C) hohen IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumoren sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen (D-E). 63
- Abbildung 8:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 72
- Abbildung 9:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens bei einer differenziert nach der IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 74
- Abbildung 10:** Graphische Darstellung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens differenziert nach der IDO1-Expresion in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 84
- Abbildung 11:** Graphische Darstellung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens differenziert nach der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 86
- Abbildung 12:** Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) auf die Expression von CD68, CD163 und IDO1. 91

- Abbildung 13:** Quantifizierung und Vergleich der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zwischen den Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom, subgruppiert in die jeweils vorliegenden UICC-Stadien, und der gesunden Kontrollkohorte. 95
- Abbildung 14:** Verlauf der IDO1-Expression in der Gesamt-peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-Population und in den CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-Zellen innerhalb von zwei Wochen post operationem 96
- Abbildung 15:** Quantifizierung und Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor (TU)- und gesundem Nachbargewebe (adjacent area, AA). 98
- Abbildung 16:** Serumkonzentrationen von Kynurenin (Kyn) und Tryptophan (Trp) sowie deren Ratio zum Zeitpunkt der primären Tumorresektion in Abhängigkeit von der T- und N-Klassifikation. 101
- Abbildung 17:** Korrelation der Kynurenin/Tryptophan-Ratio (Kyn/Trp-Ratio) im Serum mit der IDO1-Expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). 102
- Abbildung 18:** Verlauf der Serumkonzentrationen von Kynurenin (Kyn), Tryptophan (Trp) und ihrer Ratio (Kyn/Trp-Ratio) innerhalb von zwei Wochen post operationem. 104
- Abbildung 19:** Exemplarische Darstellung einer (A) niedrigen, (B) mittleren und (C) hohen TREM2-Expression auf Immunzellen der Primärtumoren sowie äquivalent dazu in den Lymphknotenmetastasen (D-E). 106
- Abbildung 20:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der TREM2-Expression in Immunzellen der Primärtumore anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 112
- Abbildung 21:** Graphische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens differenziert nach der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen anhand von Kaplan-Meier-Kurven. 120
- Abbildung 22:** Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) auf die Expression von CD68, CD163, CD206 und TREM2. 125
- Abbildung 23:** Quantifizierung und Vergleich der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zwischen der Patientenkohorte mit oralem Plattenepithelkarzinom, subgruppiert in die jeweils vorliegenden UICC-Stadien, und der gesunden Kontrollkohorte. 129

**Abbildung 24:** Quantifizierung und Vergleich der Makrophagenpopulationen zwischen Tumor (TU)- und gesundem Nachbargewebe (adjacent area, AA). 131

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> T-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)	19
<b>Tabelle 2:</b> N-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)	19
<b>Tabelle 3:</b> M-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)	20
<b>Tabelle 4:</b> UICC-Stadien des oralen Plattenepithelkarzinoms (8. TNM-Klassifikation)	21
<b>Tabelle 5:</b> Grading des oralen Plattenepithelkarzinoms	21
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht über die zurzeit bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms eingesetzten Immuncheckpointinhibitoren	25
<b>Tabelle 7:</b> Scoring der immunhistochemischen Färbung von IDO1	45
<b>Tabelle 8:</b> Scoring der immunhistochemischen Färbung von TREM2	45
<b>Tabelle 9:</b> Antikörper des IDO1-Panels der durchflusszytometrischen Messung	54
<b>Tabelle 10:</b> Antikörper des TREM2-Panels der durchflusszytometrischen Messung	54
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften innerhalb der analysierten Kohorte	65
<b>Tabelle 12:</b> Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Epithelzellen der Primärtumore	68
<b>Tabelle 13:</b> Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Immunzellen der Primärtumore	70
<b>Tabelle 14:</b> Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der IDO1-Expression in Primärtumoren	76
<b>Tabelle 15:</b> Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der IDO1-Expression in Primärtumoren	76
<b>Tabelle 16:</b> Auflistung der klinischen und histopathologischen Parameter innerhalb der analysierten Kohorte mit Lymphknotenmetastasen	78
<b>Tabelle 17:</b> Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Epithelzellen der Lymphknotenmetastasen	80

<b>Tabelle 18:</b> Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der IDO1-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen	82
<b>Tabelle 19:</b> Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Parametern sowie der IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen	88
<b>Tabelle 20:</b> Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Parametern sowie der IDO1-Expression in Lymphknotenmetastasen	88
<b>Tabelle 21:</b> Auflistung der klinischen Parameter der Patientenkohorte für die durchflusszytometrische Untersuchung der IDO1-Expression	92
<b>Tabelle 22:</b> Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften der Patientenkohorte	108
<b>Tabelle 23:</b> Korrelation der klinischen Parameter mit der TREM2-Expression in Immunzellen der Primärtumore	110
<b>Tabelle 24:</b> Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Primärtumoren	114
<b>Tabelle 25:</b> Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Primärtumoren	114
<b>Tabelle 26:</b> Auflistung der klinischen und histopathologischen Eigenschaften der Patientenkohorte mit Lymphknotenmetastasen	116
<b>Tabelle 27:</b> Korrelation der klinischen und histopathologischen Parameter mit der TREM2-Expression in Immunzellen der Lymphknotenmetastasen	118
<b>Tabelle 28:</b> Univariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Markern sowie der TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen	122
<b>Tabelle 29:</b> Multivariat-Analyse des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Marken sowie der TREM2-Expression in Lymphknotenmetastasen	122
<b>Tabelle 30:</b> Auflistung der klinischen Parameter der Patientenkohorte für die durchflusszytometrische Untersuchung der TREM2-Expression	126
	197

**Tabelle 31:** Korrelation der sTREM2-Konzentration mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften

133

## 10. Tabellarischer Anhang

**Table 1: Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Firma
Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific
Biosphere SafeSeal Tube (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Deckglas	Thermo Fisher Scientific
Eukitt Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich
Filterspitzen "Avantguard" (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axon Labortechni
Monovette EDTA	Sarstedt
Monovette Serum-Gel	Sarstedt
Multifly-Kanüle	Sarstedt
Nunc™ Kryoröhrchen für Biobanking und Zellkulturen 1.8mL	Thermo Fisher Scientific
PAP pen for immunostaining	Sigma-Aldrich
Röhrchen, konisch (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One

**Table 2: Geräte**

Artikel	Firma
Axio Scan.Z1	Zeiss
FACS Canto II	BD Biosciences
gentleMACS Octo Dissociator with heaters	Miltenyi Biotec
Heraeus Multifuge 3S	Marshall Scientific
iMark Microplate Absorbance Reader	Biod Rad
Luna Cell Counter	Logos Biosystems
Mr. Frosty Einfrierboxen	Nalgene
Zentrifuge 5425	Eppendorf

**Tabelle 3: Chemikalien**

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
BLOXALL Endogenous Blocking Solution, Peroxidase and Alkaline Phosphatase	Vector Laboratories
Citrat Buffer, pH 6.0, 10x	Sigma-Aldrich
Ethanol, >99,8 % absolute	Sigma-Aldrich
Fc Block	BD Biosciences
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
Ficoll Paque Plus - Cytiva	Sigma-Aldrich
Formaldehyde 4%, Methanol-Free	Cell Signaling
Gibco TM PBS-Tabletten	Thermo Fisher Scientific
Hematoxylin Solution (Mayer's, Modified) (ab220365)	Abcam
Lab Vision TM Tween™ 20 Detergent	Thermo Fisher Scientific
MACS Tissue Storage Solution	Miltenyi Biotec
Normal Horse Serum Blocking Solution, 2.5%	Vector Laboratories
Phosphate Buffered Saline (PBS) (1X)	Thermo Fisher Scientific
2-Propanolol, >99,8%	Sigma-Aldrich
RPBMI 1640, HEPES	Thermo Fisher Scientific
Xylol Isomer	VWR International

**Tabelle 4: Kits**

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
ImmPRESS HRP Universal (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG) PLUS Polymer Kit	Vector Laboratories
Impact Dab Eqv Substrate Kit	Vector Laboratories
Kynurenine ELISA BA E-2200	ImmuSmol
TREM2 ELISA ab224881	Abcam
Tryptophan ELISA BA E-2700	ImmuSmol
Tumor Dissociation Kit human	Miltenyi Biotec

**Tabelle 5: Antikörper**

Name	Spezie	Fluorophor	Clone/ Firma
CD163	Maus	BV421	GHI/61/ Biolegend
CD206	Maus	AF647	15-2/Biolegend
CD68	Maus	FITC	Y1/82A/ Biolegend
IDO1	Kaninchen	AF647	D5J4ETM/ Cell Signaling
IDO1	Maus	AF647	V50-1886/Biolegend
TREM2	Kaninchen	APC-Cy7	D8I4C/Cell Signaling
TREM2	Maus	AF700	2B5/Novus Biologicals

**Tabelle 6:-Puffer und -Lösungen für die Immunhistochemie**

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH-Wert 7,4; ad 1000 ml dd H <sub>2</sub> O
10x Citratpuffer	29,4g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; ad 800 ml dd H <sub>2</sub> O

## 11. Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Kolja Freier sowie Herrn PD Dr. Dr. Dominik Horn für die hervorragende Betreuung und die stetige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. Dalia Alansary danke ich für die Einführung in die Durchflusszytometrie.

Herrn PD Dr. Mathias Wagner sowie den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für die Durchführung der immunhistochemischen p16-Färbungen und der HPV-DNA-In-situ-Hybridisierung.

Herrn Dr. Philipp Wartenberg vom Institut für Toxikologie und Dr. Anja Scheller vom Institut für Physiologie danke ich für das Scannen der TMAs und Gewebeschnitte.

Den Mitarbeitern des José-Carreras-Center danke ich für die Hilfe bei methodischen Fragestellungen.

Herrn Dr. Dr. Michael Fehrenz, Frau Anne Radermacher und Frau Dr. Laura Artoni-Möller danke ich für die Zusammenarbeit im Labor.

## **12. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.