

Aus dem Bereich
Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Expression von Immunrezeptoren in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in
Abhängigkeit des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels und des HPV-Status**

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

2019

vorgelegt von: Helge Anand Krebs-Fleischmann
geb. am 10.12.1995 in Penang/Malaysia

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
1. Zusammenfassung / summary	1
2. Einleitung	5
2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs)	5
2.1.1 Ätiologie, Epidemiologie und Pathogenese	5
2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose	9
2.2 Vitamin-D und das Immunsystem	11
2.2.1 Vitamin-D - Vorkommen, Physiologie und Funktion	11
2.2.2 Definition des Vitamin-D-Status	13
2.2.3 Die Vitamin-D-Versorgung und Definition eines Vitamin-D-Mangels	13
2.2.4 Das humane Immunsystem	14
2.2.4.1 Zelluläre Komponenten des menschlichen Immunsystems	14
2.2.4.2 Humorale Komponenten des menschlichen Immunsystems	17
2.2.5 Rolle von Vitamin-D in Bezug auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem	17
2.3 Assoziation zwischen dem Immunsystem und Krebserkrankungen	20
2.3.1 Komponenten einer Anti-Tumor-Immunreaktion	20
2.3.2 Rolle der Immun-Checkpoint-Moleküle in der Kopf-Hals-Onkologie	22
2.4 Eigene Fragestellung	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Material und Herstellernachweis	26
3.1.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien	26
3.1.2 Chemikalien	27
3.1.3 Primärantikörper	28
3.1.4 Sekundärantikörper	29
3.1.5 Zelllinien	29
3.2 Immunhistochemische Analysen	30
3.2.1 Immunhistochemie	30
3.2.2 Gewebepräparation und Fixierung	30
3.2.3 Versuche zur Etablierung der Standardfärbeprotokolle	31
3.2.4 Allgemeiner Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen	34
3.2.5 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	35
3.3 Molekularbiologische Analysen und Methoden der Zellkultivierung	36
3.3.1 Kultivierung der FaDu-Zelllinie	36
3.4 Analytische Methoden der Proteinbiochemie	38
3.4.1 Aufbereitung der Zellproben für die Western Blot-Analyse	38

Abkürzungsverzeichnis

3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.4.3	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blotting)	40
3.4.4	Immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen	40
3.5	Statistische Analysen	41
3.6	Tumorklassifikation, Staging und Differenzierung	41
3.7	Anonymisiertes Patientenkollektiv	42
3.7.1	Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel	42
3.7.2	Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung	45
4.	Ergebnisse	47
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	47
4.1.1	Assoziation zwischen Vitamin-D- und HPV-Status	48
4.2	Charakterisierung der Präparate	49
4.2.1	Präparatgröße, Leukozytenzahl, Leukozyteninfiltration	49
4.2.2	Auswertung der TNM-Stadien	50
4.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen	50
4.3.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD80 an HNSCCs	51
4.3.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von B7-H3 (CD276) an HNSCCs	54
4.3.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von B7-H4 an HNSCCs	56
4.3.4	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PD-L1 an HNSCCs	58
4.3.5	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von MHC1 an HNSCCs	62
4.4	Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse	63
4.5	Überlebensanalyse	64
4.5.1	Überlebensanalyse abhängig vom HPV- und Vitamin-D-Status	64
4.5.2	Überlebensanalysen des Patientenkollektivs abhängig vom Vitamin-D-Status sowie immunhistochemischer Parameter	65
4.6	Analyse der Immunrezeptorexpression in der FaDu-Zelllinie	67
5.	Diskussion	70
5.1	Relevanz von Vitamin-D und dem therapeutischen Konzept der Immun-Checkpoint-Blockade in der Kopf-Hals-Onkologie	70
5.2	Vitamin-D- und HPV-Status - Einfluss auf die Immunrezeptorexpression und Prognose bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sowie therapeutische Implikationen	74
5.3	Versuche zur Bestimmung der Immunrezeptorexpression in der FaDu-Zelllinie	83
5.4	Ausblick und Fazit	85
6.	Literaturverzeichnis	88
7.	Publikationen	98
8.	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMPS	Ammoniumperoxidisulfat
APC	antigenpräsentierende Zelle (antigen-presenting cell)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CTL	CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Tetraethylendiaminoessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
et al.	und andere
FCS	fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest}	destilliertes Wasser
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humanes Papillomavirus
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRS	immunreaktiver Score
kDA	Kilodalton
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Milliliter
mA	Milliampere
M	Molarität (entspricht der molaren Masse in einem Liter)
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
µg, µm, µl, µM	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter, Mikromolar
n	Stichprobenumfang
ng, nm, nl, nM	Nanogramm, Nanometer, Nanoliter
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
p	statistischer Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Standardsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastomprotein
RM	raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-ionenkonzentration
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS-Tween 20
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-Cell-Receptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolettes Licht
VDA	Patientenkollektiv mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung
VDM	Patientenkollektiv mit Vitamin-D-Mangel
v/v	Volumenprozent („volume/volume“)
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent („weight/volume“)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Als sechst häufigste Tumorentität weltweit zählen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zu den Tumorerkrankungen mit schlechten prognostischen Aussichten: Die 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 50%-60% konnte in den vergangenen Jahren trotz neuer Therapieansätze nur unwesentlich verbessert werden, was zum Einen ursächlich auf die enorme Variabilität im Therapieansprechen multimodaler Behandlungsverfahren, den daraus resultierenden funktionellen und ästhetischen Defiziten sowie den damit einhergehenden Nebenwirkungen zurückzuführen ist. Zum Anderen erfolgt bei der Mehrzahl der Fälle eine sehr späte Diagnosestellung, welche einschränkende Auswirkungen auf die Wahl der Therapiemaßnahmen hat und die Identifikation des Tumorentstehungsortes oft erschweren kann. Kopf-Hals-Tumoren sind gekennzeichnet durch eine komplexe mutationslastige Tumormikroumgebung, welche zum Teil für das limitierte Ansprechen zielgerichteter medikamentöser Therapien verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund besteht eine Notwendigkeit, neue Biomarker aufzudecken, die eine Früherkennung der Karzinome erleichtern, eine verbesserte Prognose-einschätzung erlauben und für den individuellen Patientenfall effektive Therapieoptionen ermöglichen. Mit Vitamin-D, einem Hormon mit vielfältigen physiologischen Effekten auf zahlreiche Organ-systeme, werden multiple immunstimulierende Eigenschaften und eine gewisse antitumorale Potenz assoziiert, die über zelluläre und humorale Mechanismen moduliert wird. Dazu kommt, dass die Mehrzahl der an einem Kopf-Hals-Tumor erkrankten Patienten einen ausgeprägten Vitamin-D-Mangel aufweisen und diese Tumorentität in der Regel mit immunsuppressiven Eigenschaften einhergeht. In dieser Arbeit wurde demnach der Frage nachgegangen, ob der Vitamin-D-Status von Kopf-Hals-Tumorpatienten eine Auswirkung auf molekulare Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem haben und die dadurch vermittelte Immunsuppression einschränken könnte.

Von dieser Grundüberlegung ausgehend wurden Tumorgewebeprobe von 112 Kopf-Hals-Karzinompatienten auf das Expressionsverhalten der Immun-Checkpoint-Moleküle CD80, B7-H4, B7-H3 sowie PD-L1 und dem zellulären Oberflächenproteinkomplex MHC1 immunhistochemisch analysiert. Das Patientenkollektiv gliederte sich dabei in Abhängigkeit vom 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel in eine Patientengruppen bestehend aus 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (25-OH-Vitamin-D < 10 ng/ml) sowie 52 Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (25-OH-Vitamin-D > 10 ng/ml). Die immunhistochemischen Färbungen wurden semiquantitativ mit Hilfe eines immunreaktiven Scores ausgewertet. Zusätzlich wurde die Expression der oben genannten Moleküle in kultivierten Kopf-Hals-Tumorzellen der FaDu-Zelllinie mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot als Grundlage für weiterführende funktionelle Untersuchungen analysiert.

Die Färbungen bestätigten eine positive Korrelation zwischen einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und einer verstärkten Expression stimulierender Immun-Checkpoint-Moleküle auf den Tumorzellen im Sinne eines immunstimulativen, antitumoralen Einfluss des Vitamin-D: Bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung zeigte sich zum einen eine vermehrte tumorale Expression der immunstimulierenden Marker CD80 ($p = 0,0707$) und MHC1 ($p = 0,0190$)

und zum anderen eine gesteigerte peritumoral-leukozytäre CD80-Expression ($p = 0,0324$). Eine vermehrte tumorale MHC1-Expression korrelierte zudem positiv mit dem HPV-Status ($p = 0,0053$) und ging mit einem verlängerten Gesamtüberleben einher ($p = 0,0325$). Das immunzellinhibierende Immun-Checkpoint-Molekül B7-H4 war auf Tumoren von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ($p = 0,0705$) und bei HPV-negativen Tumoren ($p = 0,1332$) unabhängig vom Vitamin-D-Status vermehrt exprimiert, sodass dieses Resultat übereinstimmend mit den dargestellten Ergebnissen der immunzellaktivierenden Moleküle auf eine geförderte antitumorale Aktivität des menschlichen Immunsystems bei Kopf-Hals-Tumorpatienten durch Vitamin-D hindeutet sowie im Einklang mit der Tatsache steht, dass HPV-negative Kopf-Hals-Tumoren starke immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. B7-H3, welches sowohl immunstimulierende Effekte als auch immunsupprimierende Funktionen ausüben kann, war bei Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung auf Tumorzellen klar überexprimiert ($p = 0,0052$) und ging mit einem signifikanten Überlebensvorteil einher ($p = 0,0037$). Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung durch gesteigerte Immunzellinfiltration und geringere immunsuppressive Prozesse in der Tumormikroumgebung möglicherweise eher die co-stimulatorischen Effekte überwiegen. Bei Betrachtung der tumoralen ($p = 0,4730$) und leukozytären ($p = 0,4032$) PD-L1-Expression, konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Vitamin-D-Serumspiegels und dem Expressionsverhalten nachgewiesen werden. Jedoch korrelierte der HPV-Status positiv mit der PD-L1-Tumorexpression ($p = 0,0784$), was durch die hohen IFN- γ -Spiegel im Rahmen der antitumoralen immunologischen Aktivität bedingt sein könnte. Eine vermehrte PD-L1-Expression auf Tumorzellen war insbesondere bei Tumorpatienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung mit schlechten prognostischen Aussichten verbunden ($p = 0,0613$). Im vorliegenden Patientenkollektiv führte eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung in Relation zu Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel zu einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben von durchschnittlich 10 Monaten ($p = 0,0288$). In der Western Blot-Analyse der Immun-Checkpoint-Molekül-Expression in FaDu-Zellen konnte lediglich für PD-L1 ein Signal nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse demonstrieren, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung gerade in der Kopf-Hals-Onkologie von hoher prognostischer und therapeutischer Relevanz sein kann, da überwiegend immunsuppressive Signalwege in der Tumormikroumgebung durch eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung und einen positiven HPV-Status verhältnismäßig eingeschränkt werden, sodass eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort generiert werden kann und tumorprogressions-fördernde Eigenschaften reduziert werden. Diese Daten liefern Anhaltspunkte dafür, dass neben einer fokussierten Betrachtung der immunologischen Organisation in Kopf-Hals-Tumoren funktionell-immunologische Veränderungen im Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Status weiter untersucht werden sollten mit der Zielsetzung durch Vitamin-D induzierte Veränderungen in der zellulären und humoralen Komposition der Tumormikroumgebung zu identifizieren. Aktuell sind *in vitro*-Experimente an HNSCC-Zelllinien, die mit aktivem Vitamin-D in sowohl supraphysiologischen

als auch physiologischen Konzentrationen behandelt werden in Planung. Letztlich könnte eine ergänzende Vitamin-D-Substitution bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten im Zuge eines multimodalen Therapiekonzeptes die prognostische Perspektive sowie die Effektivität einer Immuntherapie verbessern.

1. Summary

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer globally with 5-year-survival-rates as low as 50%–60%, thus indicating poor prognosis. However the approval of few novel therapeutic modalities in recent years has not substantially improved prognosis for head and neck cancer patients, due to several reasons: First of all, treatment can be quite morbid whilst creating side effects and resulting in significant functional as well as aesthetic deficits. Secondly, late stage diagnosis often limits therapeutical approaches and impedes the identification of the exact tumor location. Additionally, the complex mutational landscape in head and neck cancer may account for insufficient response of targeted therapies, since most tumors evolve under treatment-associated selective pressures and possess various genetic drivers of oncogenesis. For this reason, it remains necessary to identify new prognostic and predictive biomarkers, which facilitate an early detection of cancer and enable novel therapeutic strategies. The physiologically active hormone Vitamin-D is linked with modulatory functions on the human immune system and favors antitumor immunity by initiating cellular and humoral effects. Moreover, the vast majority of patients suffering from head and neck cancer display a considerable Vitamin-D deficiency and this tumor entity is often associated with a predominantly immune suppressive landscape.

Tumor tissue samples from 112 HNSCC patients, of which 51 had adequate serum levels of Vitamin-D (25-OH-Vitamin-D > 10 ng/ml) while 61 exhibited a Vitamin-D deficiency (25-OH-Vitamin-D < 10 ng/ml), were subjected to conventional immunohistochemistry in order to assess the influence of Vitamin-D on the immunological crosstalk between tumor and immune cells. To address this, the expression of immunoregulative proteins MHC1, B7-H4, B7-H3, PD-L1 and CD80 was analyzed. Additionally, the expression of the same molecules was studied on FaDu-cells, an immortalized HNSCC cell line, by performing a SDS-gel-electrophoresis and western blot.

The evaluation of the immunohistochemical stainings with a semiquantitative immunoreactivity score demonstrated that an adequate Vitamin-D status was associated with a higher tumoral expression of CD80 ($p = 0,0707$) and MHC1 ($p = 0,0190$), thus confirming the immune stimulatory and anti-tumorigenic influence of Vitamin-D. Peritumoral leukocytes expressed more CD80 among patients with higher Vitamin-D levels ($p = 0,0324$). Higher tumor levels of MHC1 correlated positively with a positive HPV-Status ($p = 0,0053$) and an improved overall survival ($p = 0,0325$). In conformity with these results, an increased B7-H4 tumor expression was observed among patients with Vitamin-D deficiency ($p = 0,0705$) and negative HPV-Status ($p = 0,1332$), which might be explained through the predominantly immune suppressive tumor landscape among these patients, as B7-H4 is considered immune inhibitory. B7-H3, which is thought to serve as both a co-inhibitor and co-stimulator of T-cell

responses, was clearly overexpressed in tumor tissue from patients with adequate Vitamin-D serum levels ($p = 0,0052$) and correlated with an improved overall survival among these patients ($p = 0,0037$), implying that the altered tumor microenvironment in patients with sufficient Vitamin-D supply may promote co-stimulatory interactions. No considerable influence was detectable for the expression of PD-L1 on both tumor ($p = 0,4730$) and leukocytes ($p = 0,4032$). However, a positive HPV-status was associated with a high PD-L1 expression on tumor tissue ($p = 0,0784$), which may have occurred due to high IFN- γ -levels in the context of a strong antitumorigenic immune activity in HPV-positive tumors. High tumoral PD-L1 expression among patients with elevated Vitamin-D serum levels was linked with poor prognostic outcome ($p = 0,0613$). In accordance with all these findings, an adequate Vitamin-D status significantly correlated with an improved overall survival among head and neck cancer patients ($p = 0,0288$), as these patients lived 10 months longer on average compared to patients with Vitamin-D deficiency. Merely a signal associated with PD-L1 expression was observed through western blot analysis in cultured FaDu cells with no significant expression of all other immune checkpoint molecules.

In summary, the obtained results clearly emphasize the prognostic and therapeutic relevance of an adequate Vitamin-D supply for patients suffering from head and neck squamous cell carcinoma, by revealing that normal Vitamin-D blood levels and a positive HPV-status limit immunosuppressive interactions within the tumor microenvironment, which in turn leads to more potent antitumorigenic immune responses and impaired tumor progression. These results provide an informative basis for a specific examination of the immunological landscape in head and neck cancer, which should aim at identifying potentially through Vitamin-D inducible alterations considering cellular and humoral elements in the tumor microenvironment. Ongoing *in vitro*-experiments with HNSCC-cell lines, treated with supraphysiological and physiological concentrations of active Vitamin-D are further addressing these issues. Ultimately, supplying HNSCC-patients with Vitamin-D may support antitumorigenic immune responses in an immunotherapeutic setting as part of a multimodal therapy whilst simultaneously contributing to the improvement of the patients' prognosis.

2. Einleitung

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs)

Als sechst häufigste Krebserkrankung weltweit sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs („head and neck squamous cell carcinoma“, HNSCC) für viele Fälle von Krebs-assoziiierter Mortalität und Krankheitsleiden verantwortlich (Leemans et al. 2011). Die ungünstige Prognose dieser Tumorentität spiegelt sich in der 5-Jahres Überlebensrate wider, die in der Größenordnung zwischen 50% und 60% liegt (Leemans et al. 2011, Vokes et al. 1993). Die Hauptgruppe der Patienten liegt im Altersbereich zwischen 50 und 70 Lebensjahren. Darunter sind Männer wesentlich häufiger betroffen als Frauen (Vokes et al. 1993). Dieser deutliche geschlechtsspezifische Unterschied in der Inzidenz resultiert aus der unterschiedlichen Assoziation und Exposition der Risikofaktoren unter Männern und Frauen. Das Spektrum der HNSCCs umfasst alle Karzinomtypen, die von einem Schleimhaut-epithelium des oberen Aerodigestivtraktes ausgehen: Dazu zählen im Wesentlichen die Mundhöhle, der Oropharynx, der Hypopharynx, der Nasopharynx und der Larynx, wobei die Mundhöhle und der Larynx mit etwa 70% am häufigsten betroffen sind. Pharynxkarzinome treten in einem Viertel der Fälle auf (Leemans et al. 2011). In Deutschland erkranken etwa 13596 Menschen pro Jahr neu an Pharynx- oder Mundhöhlenkarzinomen und 3640 Menschen an Larynxtumoren (GLOBOCAN 2018, Bray et al. 2018).

2.1.1 Ätiologie, Epidemiologie und Pathogenese

Zu den führenden Ursachen und Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCCs zählen in etwa drei Viertel der Fälle ein erhöhter Tabakkonsum bzw. Alkoholabusus (Leemans et al. 2011, Abb. 1). Diese Noxen schädigen die DNA der Zellen der Mund-, Rachen- und Larynxschleimhaut und es kann zu Mutationen in Genen kommen, deren kodierte Proteine an der Kontrolle des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung sowie des Zellzyklus beteiligt sind. Sowohl ein Funktionsverlust tumorsupprimierender Faktoren als auch eine Überstimulation bzw. Dysregulation zellproliferationssteigernder Signalkaskaden führen im Laufe der Zeit zu einer überschießenden Neubildung von entdifferenziertem Gewebe, welches sich den Regulationsmechanismen für Wachstum und Zellvermehrung entzieht und somit auch invasiv voranschreiten kann (Leemans et al. 2018, Abb. 1). Ätiologisch konnte in einigen Subentitäten eine Assoziation mit dem humanen Papillomavirus (HPV) (Maxwell et al. 2016) und im Falle des Nasopharynxkarzinom eine Epstein-Barr-Virus (EBV) - Assoziation (Vokes et al. 1993) nachgewiesen werden. Mit einem Anteil von etwa 0,6% aller Tumorerkrankungen stellt das Nasopharynxkarzinom eine vergleichsweise seltene Tumorerkrankung dar, die verhältnismäßig häufiger in Afrika sowie Südostasien vorkommt (GLOBOCAN 2018, Bray et al. 2018). An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass auf Grund der geringen Relevanz im europäischen Raum und in Bezug auf die vorliegende Arbeit, auf eine nähere Charakterisierung dieser seltenen Tumorentität verzichtet wird. Im Gegensatz dazu repräsentiert die Gruppe der nikotin- und alkoholassozierten HNSCCs vor allem in Europa und industrialisierten Ländern die überwiegende Mehrzahl der Tumore im Kopf-Hals-Bereich (Meurmann 2010): Dabei besteht eine eindeutig positive

Einleitung

Korrelation zwischen Grad der Risikofaktorexposition und dem Karzinomrisiko (Hashibe et al. 2009). Im Kontext der noxeninduzierten Karzinogenese von HNSCCs können Kofaktoren, wie eine schlechte Mund- und Zahnhygiene sowie eine pathologisch veränderte Speichelzusammensetzung die Tumorentstehung begünstigen (Hashim et al. 2016 INHANCE consortium).

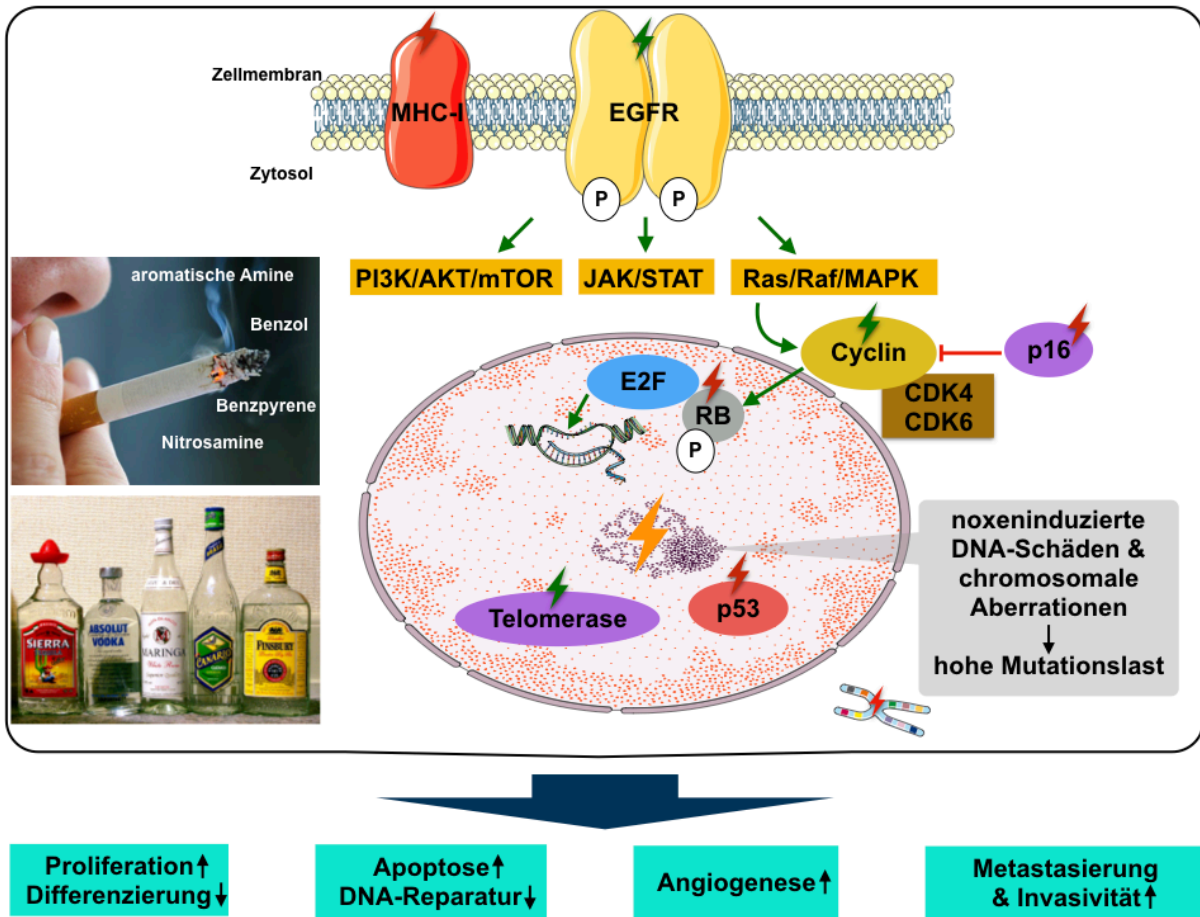


Abb. 1: Molekulare Tumorzellbiologie des HPV-unabhängigen HNSCC. Ätiologisch induzieren Inhalationsstoffe des Zigarettenrauches und die durch den Konsum von hochprozentigem Alkohol anfallenden zytotoxischen Abbauprodukte noxeninduzierte DNA-Schäden, die zur Akkumulation von Mutationen und chromosomalen Aberrationen in gesunden Zellen führen können. Durch die hohe Mutationslast kann über Zeit ein maligner Zellphänotyp entstehen. Molekularbiologisch bedeutsam für die Tumorprogression sind insbesondere Mutationen in Tumorsuppressorgenen, die für Proteine wie p53, p16 oder RB (Retinoblastom-Protein) kodieren, da es hierdurch zu einer unkontrollierten Proliferation durch Aufhebung der Zellzyklus-Kontrolle und eingeschränkten DNA-Reparaturprozessen der Tumorzelle kommt. Durch Inaktivierung von RB wird die biologische Transkription über E2F begünstigt. Hinzu kommt, dass in HNSCC die Expression und Aktivierung des Epidermalen Growth Factor Receptor (EGFR) gesteigert ist, wodurch über verschiedene Signalwege das Tumorwachstum beschleunigt wird. Weiterhin wird häufig eine erniedrigte MHC1-Expression auf der Zelloberfläche von Kopf-Hals-Tumorzellen beobachtet, die mit einer Beeinträchtigung der immunologischen Erkennung und Elimination von entarteten Zellen einhergehen kann. Das Zusammenspiel dieser molekularen Prozesse fördert die Proliferation, Metastasierung, Angiogenese und genetische Instabilität des Tumors und reduziert zelluläre Differenzierungs- sowie DNA-Reparaturmechanismen. Grüne Pfeile kennzeichnen einen stimulierenden Prozess, während rote Pfeile für eine Inhibition stehen. Grüne Blitze symbolisieren eine Überstimulation bzw. Funktionsgewinnmutation, während rote Blitze eine Funktionsverlustmutation bzw. eine verminderte Expression des entsprechenden Proteins kennzeichnen. Quellen der Grafiken: <https://image.stern.de/6874612/16x9-940-529/f20db71b7f1aee9ebab71f952bff86e5/go/rauchstopp-bild.jpg>; <http://deacademic.com/pictures/dewiki/65/Alkoholika.jpg>

Neben dem Nikotin- und Alkoholabusus konnte in den vergangenen Jahren eine Infektion der Mundschleimhaut mit humanen Papillomaviren als weiterer möglicher Risikofaktor für die Entstehung von HNSCCs, insbesondere die Subgruppe der Oropharynxkarzinome, identifiziert werden (Marur et al. 2010, Klussmann et al. 2003, Lewis et al. 2015). Die Mechanismen der HPV-induzierten Karzinogenese konnten am besten beim Zervixkarzinom aufgedeckt und charakterisiert werden: Bestimmte HPV-Virusvarianten sind mit dem invasiven Zervixkarzinom assoziiert und werden als Hochrisikotypen („high-risk“) von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bezeichnet. Dazu zählen die HPV-Typen 16, 18, 31 und 33 (Woodman et al. 2007). Einige dieser Hochrisikotypen konnten in Biopsien von Mundhöhlen- (23,5%) und Oropharynxkarzinomen (35,6%) nachgewiesen werden, wobei HPV-Typ 16 den am häufigsten vorkommenden Genotyp in HNSCCs darstellt (Marur et al. 2010, Lewis et al. 2015). Als doppelsträngiges DNA-Virus befällt das HPV-Virus die epitheliale Basalzellschicht, integriert sein Genom in die Wirtszell-DNA und wird im Rahmen zellulärer Differenzierungsvorgänge in immer höhere Zelllagen transportiert, vorausgesetzt die Wirtszelle proliferiert (Leemans et al. 2018). Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 fördern die Tumorumprogression durch Inaktivierung von zellulärem RB und p53, wobei letzterem Protein im Rahmen von Apoptoseinduktion und zellulären Reaktionsmechanismen auf DNA-Schäden eine Schlüsselbedeutung zukommt (Abb. 2). Zudem aktiviert E6 die zelluläre Telomerase, welche in konsekutiver Weise ein immortales Wachstumsverhalten einer infizierten Zelle ermöglicht (Leemans et al. 2018, Lindquist et al. 2007, Abb. 2). Das Zusammenspiel dieser Faktoren resultiert in einer Dysregulation des Zellzyklus und begünstigt die Akkumulation von DNA-Mutationen (Abb. 2). Funktionsverlustmutationen im p53 kodierenden Gen kommen im Gegensatz zu den alkohol- und tabakinduzierten Kopf-Hals-Tumoren mit vergleichsweise hoher Mutationslast deutlich seltener vor. (Seiwert et al. 2015).

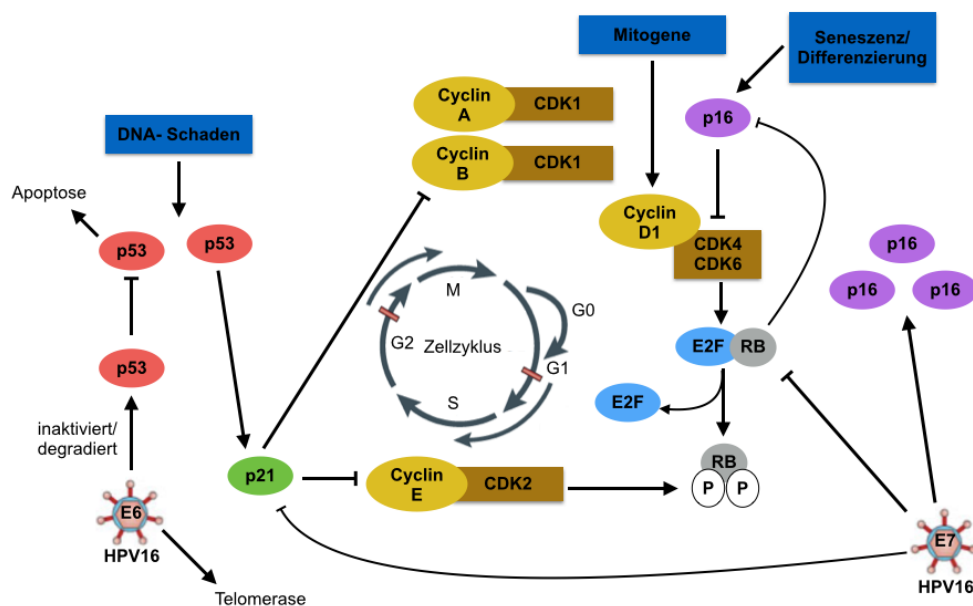


Abb. 2: Deregulierung des Zellzyklus durch humane Papillomviren am Beispiel des „high-risk“ Typs HPV 16. Durch Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und RB fördern die HPV-Onkoproteine E6 und E7 die Tumorumprogression.

Einleitung

Die HPV-induzierten Kopf-Hals-Tumore repräsentieren etwa ein Drittel aller HNSCCs (Marur et al. 2010, Lewis et al. 2015) und beschränken sich im Wesentlichen auf den Oropharynxbereich einschließlich Zungengrund und Tonsillen. Die aktuell beobachtete steigende Inzidenz insbesondere bei jüngeren Männern ohne erhöhten Tabak- und Alkoholkonsum (<60 Jahre) in der westlichen Welt ist auf eine Inzidenzzunahme von HPV-Infektionen im Bereich des Oropharynx zurückzuführen (Pyrri et al. 2014). Diese Patienten zeigen zum Diagnosezeitpunkt im Vergleich zu Patienten mit einem noxeninduzierten Kopf-Hals-Tumor langfristig ein erniedrigtes Rezidiv- und Zweitumorrisiko (Lindquist et al. 2007, Lewis et al. 2015). Zudem haben Patienten mit einem HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumor eine günstigere Prognose was vor allem durch das jüngere Durchschnittsalter, die damit verbundene potentere Immunabwehr und einer gesteigerten tumorale Immunzellinfiltration begründet sein könnte (Mandal et al. 2016, Badoual et al. 2013, Ang et al. 2010). HPV-assoziierte Tumore der Kopf-Hals-Region tendieren im Vergleich zu noxeninduzierten HNSCCs häufiger und früher zur lymphogenen Metastasierung (Lewis et al. 2015). Klinischen Studien zufolge sprechen HPV-positive Tumorpatienten besser auf eine Radio- und Chemotherapie an (Fakhry et al. 2008, Ihloff et al. 2010). Aus diesen Gründen kann der HPV-Tumorstatus bei HNSCC-Patienten als prognostischer Biomarker in der Kopf-Hals-Onkologie herangezogen werden (Abb. 3, Ang et al. 2010).

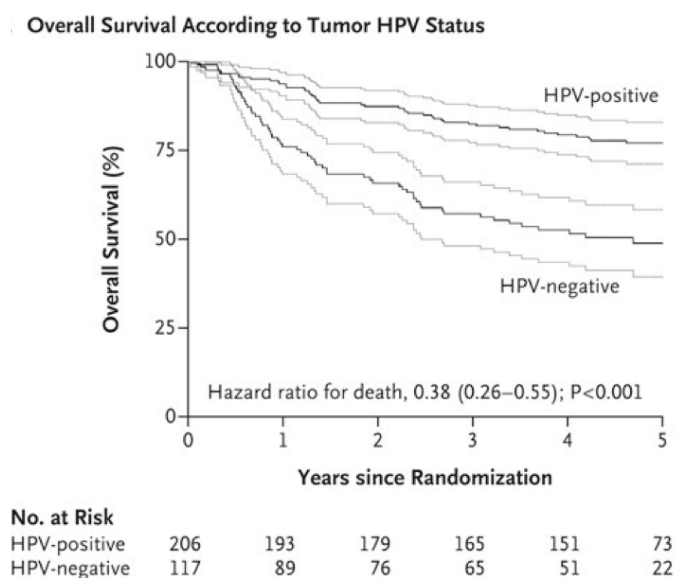


Abb. 3: Der HPV-Tumorstatus als prognostischer Biomarker bei HNSCC-Patienten. Signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei Oropharynxkarzinom-Patienten mit HPV-DNA-positivem Tumor verglichen mit Oropharynxkarzinom-Patienten mit HPV-negativem Tumor. (Ang et al. 2010)

Zur klinischen Bestimmung des Patienten-HPV-Status kann eine HPV-DNA *in situ* Hybridisierung oder eine genomische PCR verwendet werden. Indirekt kann auch über eine immunhistochemische Färbung vom Tumorsuppressorprotein p16 der HPV-Status bestimmt werden: Im Zuge der HPV-induzierten Karzinogenese kommt es zur Inaktivierung von RB durch das HPV-Onkoprotein E7, welches konsekutiv zu einer Überexpression von p16 führt, wodurch sich p16 hervorragend als immunhistologischer Marker für HPV-assoziierte Malignitäten und Dysplasien eignet (Singhi &

Westra, 2010). Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über die wesentlichen klinischen und biologischen Unterschiede hinsichtlich der Ätiologie von HNSCCs.

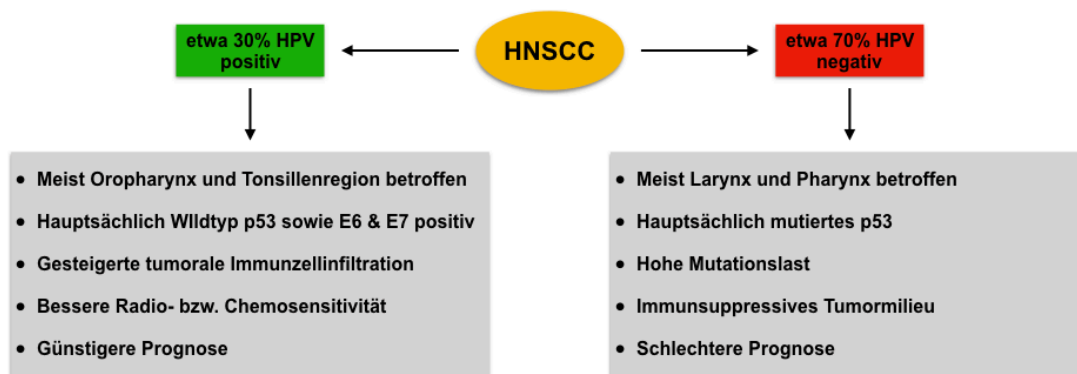


Abb. 4: Schematische Übersicht zur ätiologischen Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC). Kopf-Hals-Tumoren können in zwei Hauptgruppen untergliedert werden, die sich ätiologisch, molekulargenetisch und prognostisch unterscheiden. Etwa ein Drittel aller HNSCCs entstehen auf der Basis einer Infektion der oropharyngealen Schleimhaut mit humanen Papilloma Viren (HPV). Die Mehrzahl der Kopf-Hals-Tumoren sind auf übermäßigen Tabak- und Alkoholkonsum zurückzuführen (HPV-negativ).

In Anbetracht der epidemiologischen Entwicklung ergeben sich bei näherer differenzierter Betrachtung der HNSCC-Subtypen deutlich unterschiedliche Entwicklungstendenzen: Eine Inzidenzzunahme der HPV-assoziierten Tumorentitäten wie beispielsweise dem Oropharynxkarzinom in industrialisierten Ländern bei gleichzeitigem Rückgang der HPV-unabhängigen Tabak- und Alkohol-assoziierten Tumorfälle repräsentiert dabei einen weltweiten Trend, wobei Letzteres durch rückläufige Tendenzen bezüglich Nikotin- und Alkoholmissbrauchs bedingt sein kann (D'Souza et al. 2007). Es ist zu erwarten, dass die Inzidenz HPV-positiver Kopf-Hals Tumore im Jahre 2020 die Inzidenz der HPV-assoziierten Zervixkarzinome übersteigt (Marur et al. 2016).

2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Zur HNO-ärztlichen Abklärung malignomverdächtiger und therapierefraktärer Schleimhautveränderungen, die mit tumorassoziierter Symptomatik im Kopf-Hals-Bereich einhergehen, wird zunächst eine Panendoskopie durchgeführt. Diese Untersuchung eignet sich auch als Follow-Up-Methode mit der Möglichkeit zur bioptischen Probenentnahme aus suspekten Schleimhautbereichen, was vor allem der histologischen Diagnosesicherung und dem Ausschluss eines Zweitmalignoms dient (Rodriguez-Bruno et al. 2011, Münscher et al. 2014). Zur Anwendung im klinischen Bereich kommen zudem Staging-Untersuchungen wie eine computertomographische Untersuchungen des Halses, Thorax sowie Oberbauches, um eine Fernmetastasierung ausschließen oder im Falle der PET-CT Tumorrezidive aufspüren zu können (Wolff et al. 2012). Oft bestehen jedoch gerade bei Patienten mit (metastasierten) Kopf-Hals-Tumoren erhebliche Schwierigkeiten den Primärtumor zu lokalisieren bzw. zu identifizieren (Münscher et al. 2014), was nicht selten negative Aussichten auf eine prognostische Verbesserung und den therapeutischen Erfolg nach sich ziehen kann. Zudem sollte nicht

unerwähnt bleiben, dass etwa 50% der Kopf-Hals-Tumor-Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden oder bereits zum Erstdiagnosezeitpunkt eine Lymphknotenmetastasierung aufweisen (Goy et al. 2009, Wolff et al. 2012). Um Patienten effektiv und zielgerecht zu behandeln erscheint eine Individualisierung des Therapieregimes durch eine multidisziplinäre Herangehensweise unabdingbar (Wolff et al. 2012, Ramos et al. 2010). Von entscheidender Bedeutung bleibt daher die wissenschaftliche Aufgabe in Zukunft neue Biomarker zu identifizieren, die eine Früherkennung der Karzinome erleichtern, eine zielgerichtete Therapie im individuellen Patientenfall ermöglichen sowie eine verbesserte Einschätzung der Prognose erlauben.

Die Therapie der Wahl bei lokal begrenzten HNSCCs ist die chirurgische Resektion unter Berücksichtigung des Funktionserhalts, ggf. gefolgt von einer adjuvanten Radio- bzw. platinhaltigen Radiochemotherapie, wenn bestimmte Zusatzkriterien vorliegen (Marur et al. 2016, Ramos et al. 2010). Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren stellt die primäre Radiochemotherapie eine sinnvolle therapeutische Alternative zu einem primär chirurgischen Ansatz dar. Aktuell werden immuntherapeutische Konzepte diskutiert und erste Therapeutika haben bereits den Weg in die klinische Praxis gefunden (Ferris et al. 2016, Mehra et al. 2018): Nivolumab (Checkmate-141 Studie, Zulassung seit Anfang 2017) und Pembrolizumab (Keynote-012 Studie, Zulassung seit Mitte 2018), zwei gegen PD-1 gerichtete therapeutische Antikörper, können zur Behandlung von platinrefraktären oder metastasierenden HNSCCs eingesetzt werden (Wollenberg 2019). Kombinationen gängiger Therapieverfahren wie eine Chemo- und Strahlentherapie, die in fortgeschrittenen Tumorstadien bevorzugt eingesetzt werden, schränken die Lebensqualität der Tumorpatienten ein, da es hierdurch zu toxischen Begleiterscheinungen durch Schädigung gesunder endogener Zellen kommen kann. Außerdem können durch operative Maßnahmen funktionelle und ästhetische Defizite auftreten, wobei auch physiologische Funktionen, wie das Sprechen und Schlucken, gestört sein können (Young & Day 2013). Therapieversagen und lokoregionäre Tumorrezidive kommen bei etwa 30% der Kopf-Hals-Tumorpatienten vor und sind für die Mehrzahl der Sterbefälle verantwortlich. Dies unterstreicht die Schwierigkeiten im Rahmen der Behandlung von HNSCCs. Die 5-Jahres-Überlebensrate von HNSCC-Patienten, die bei aktuell zwischen 50% und 60% liegt, hat sich in den letzten 15 Jahren nicht bedeutend verbessert. Die geringfügige Zunahme der 5-Jahres-Überlebensrate scheint im Wesentlichen kein Ausdruck einer effizienteren Therapie zu sein, sondern ist eher dem zunehmenden Anteil HPV-positiver HNSCC-Fälle im letzten Jahrzehnt zuzuschreiben, die ohnehin eine günstigere Prognose aufweisen (Lewis et al. 2015). Lediglich die Einführung des EGFR-Antikörpers Cetuximab in die Therapieschemata lokal fortgeschrittener und metastasierter HNSCCs stellt im Rahmen einer Radioimmuntherapie eine vielversprechende Option dar, die jedoch nur bei einer selektiven Patientengruppe von Nutzen sein könnte (Ferris et al. 2015). Als weitere Meilensteine in der Therapie fortgeschrittener HNSCCs sind Nivolumab und Pembrolizumab zu berücksichtigen, welche bei weniger als 50% der behandelten Patienten ein Therapieansprechen zeigen, jedoch nur bei einem umschriebenen Patientengut indiziert sind (Wollenberg 2019). Neue in der klinischen Erprobung befindliche diagnostische und operative Verfahren, als auch präventive Maßnahmen die beispielsweise die körpereigene Immunabwehr unterstützen, könnten in Zukunft zur Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate beitragen.

Die wissenschaftlichen Untersuchungen dieser Arbeit verfolgen im Wesentlichen 2 Ziele: Zum Einen wird angestrebt, zu eruieren, inwiefern sich Vitamin-D als prognostischer und prädiktiver Biomarker für die Kopf-Hals-Onkologie eignet. Zum anderen sollen mögliche Auswirkungen eines Vitamin-D-Mangels sowie des HPV-Status auf immunbiologische Interaktionsphänomene zwischen Tumor- und Immunzellen erforscht werden. Im Folgenden wird daher zuerst ein allgemeiner Überblick über die Molekularbiologie und Physiologie des Vitamin-D gegeben, um anschließend auf das Immunsystem einzugehen. Im Anschluss wird die entscheidende Rolle des menschlichen Immunsystems bei Krebserkrankungen näher charakterisiert sowie der Einfluss von Vitamin-D auf immunologische Aspekte im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen erläutert.

2.2 Vitamin-D und das Immunsystem

2.2.1 Vitamin-D - Vorkommen, Physiologie und Funktion

Vitamin-D existiert in verschiedenen molekularen Formen, welche sich im Wesentlichen durch ihr biologisches Vorkommen und ihre Biosynthese unterscheiden (Dusso et al. 2005): Vitamin-D₂ (Ergocaliferol) kommt in einigen Pilzarten vor. Der Mensch bezieht Vitamin-D zu einem geringen Anteil aus der tierischen Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln in Form von Vitamin-D₃ (Cholecalciferol) und ist durch adäquate Sonnenlichtexposition dazu befähigt Vitamin-D selbst zu synthetisieren. Dies hat zur Folge, dass Jahres- bzw. Tageszeit und geographischer Breitengrad das Ausmaß der endogenen Vitamin-D-Produktion beeinflussen können (Holick 2017, Prietl et al. 2013): So liegen im Schnitt deutlich höhere Vitamin-D-Spiegel bei Menschen mit Wohnsitz im Äquatorbereich im Vergleich zu den Ländern der nördlichen Hemisphäre vor.

Zur endogenen Produktion von Vitamin-D₃ tragen sowohl enzymatische Prozesse in unterschiedlichen Organen als auch fotochemische Prozesse in der Haut bei (Dusso et al. 2005): Als Ausgangssubstanz dient dabei 7-Dehydrocholesterol, welches in der Haut durch Einwirkung von UVB-Strahlung mit einer Wellenlänge von 290-315 nm über eine zyklische Ringeröffnung des B-Rings in das thermodynamisch instabile Prävitamin-D₃ umgewandelt wird, welches zu Vitamin-D₃ isomerisiert. Nach Bindung an das Vitamin-D-bindende-Protein (VDBP) im Blut wird das Vitamin-D₃ in den Lebermikrosomen durch das Enzym Cytochrom P450 2R1 am C-25-Atom zu Calcidiol (25-OH-Vitamin-D₃) hydroxyliert. Die biologisch aktive Form des Vitamin-D₃, das Calcitriol (1,25-OH₂-Vitamin-D₃), wird in der Niere durch die mitochondriale 1 α -Hydroxylase aus Calcidiol durch Hydroxylierung am C-1-Atom gebildet. Dieser renale Prozess unterliegt einer eng-maschigen Regulation durch das Parathormon und den Serumspiegeln von Kalzium und Phosphat. Interessanterweise kommt die 1 α -Hydroxylase aber noch in vielen anderen Organen und Geweben vor (Abb. 5), wobei das dort gebildete Vitamin-D₃ einen sehr geringen Anteil am zirkulierenden Calcitriol-Pool ausmacht, da die Wirkung eher lokal begrenzt bleibt (Carlberg 2014, Dusso et al. 2005). Als fettlösliches Vitamin mit hormoneller Funktion greift Calcitriol durch Bindung an einen intranukleären Vitamin-D-Rezeptor als genexpressionsregulierender Transkriptionsfaktor in vielzählige Stoffwechsel- und Immunprozesse ein (Prietl et al. 2013, Abb.5): Im Zuge des Calcium- und Knochenstoffwechsels fördert Vitamin-D die intestinale Calcium- und Phosphatabsorption und

Einleitung

den Knochenmineralisationsvorgang durch Steigerung der Osteoblastenaktivität und Supprimierung der parathyreoidalen Parathormonproduktion. Des weiteren zählt neben dem Knochen und dem Darm die Niere zu den Hauptzielorganen (Abb. 5). Auf molekularer Ebene wirkt der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) durch Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) auf spezifische Gene unterschiedlicher Funktionalität (Carlberg 2014). Vitamin-D-Response-Elements (VDRE) konnten im Bereich von Promotorregionen zahlreicher Zielgene, welche in der Regulierung von zellulärer Proliferation und Differenzierung involviert sind, nachgewiesen werden (Bouillon et al. 2008): So fördert Vitamin-D unter anderem die Differenzierung hämatopoetischer und epidermaler Zelltypen (Prietl et al. 2013). Weiterhin trägt Vitamin-D zu einer Reihe von physiologisch-protectiven Effekten bei (Carlberg 2014, Abb. 5): Die antibakterielle Aktivität des Immunsystems wird stimuliert (Baeke et al. 2010), die körpereigene Insulinproduktion gesteigert, die Myokardkontraktilität erhöht (Zittermann 2006) und das Erkrankungsrisiko der multiplen Sklerose sowie anderer Autoimmunerkrankungen wird erniedrigt (Dörr et al. 2012, Dankers et al. 2016). Insbesondere bei älteren Menschen kann durch eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung das Sturzrisiko erniedrigt und konsekutiv die Häufigkeit von vertebrealen und nicht-vertebrealen Knochenfrakturen über eine Steigerung der Knochendichte reduziert werden (Broe et al. 2007).

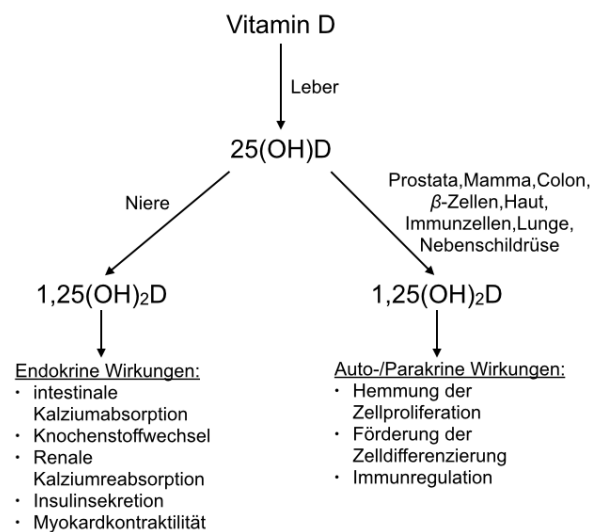


Abb. 5: Renale und extrarenale 1,25-(OH)₂-D-Produktion dient endokrinen, autokrinen und parakrinen Funktionen (modifiziert nach Dusso et al. 2005)

2.2.2 Definition des Vitamin-D-Status

Anhand des Vitamin-D-Serumspiegels kann differenziert werden, ob ein Patient einen Vitamin-D-Mangel, eine Vitamin-D-Intoxikation oder eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung aufweist. Trotz der Tatsache, dass 1,25-OH₂-Vitamin-D₃ die biologisch aktive Form des Vitamin-D darstellt, wird zur Bestimmung des Vitamin-D-Status aus folgenden Gründen der 25-OH-Vitamin-D₃-Spiegel herangezogen (Dawson-Hughes et al. 2005, Holick 2009): Zum einen beträgt die Halbwertszeit von 1,25-OH₂-Vitamin-D₃ nur 4-6 Stunden während 25-OH-Vitamin-D₃ eine Halbwertszeit von 2-3 Wochen und somit eine geringere Schwankungsbreite als aktives Vitamin-D aufweist (Dusso et al. 2005). Darüber hinaus unterliegt aktives Vitamin-D einer erhöhten regulativen Dynamik, was insbesondere zur Beurteilung eines Vitamin-D-Mangels von Bedeutung sein kann, da hier oft normale bis erhöhte Calcitriol-Spiegel vorliegen und hierdurch ein Vitamin-D-Mangel fälschlicherweise maskiert wird: Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein Vitamin-D-Mangel zunächst zu einer erniedrigten intestinalen Calciumresorption führt, sodass konsekutiv der Calcium-Serumspiegel abfällt. Über den Calcium-Sensing-Rezeptor in der Nebenschilddrüse steigert dieser Konzentrationsabfall die Parathormonproduktion, was schließlich in einer vermehrten renalen Vitamin-D₃-Produktion resultiert (Carlberg 2014). Bei 25-OH-Vitamin-D₃ handelt es sich jedoch um die Speicherform, welche die mittel- und langfristige Körperversorgung sicherstellt (Holick 2009).

2.2.3 Die Vitamin-D-Versorgung und Definition eines Vitamin-D-Mangels

Schätzungen zu Folge leiden weltweit 1 Milliarde Menschen an einem Vitamin-D-Mangel unter dem sich gerade bei Kindern durch das Krankheitsbild der Rachitis schwere Folgen wie Störungen des Skelettwachstums und hypocalziämische Symptome manifestieren können (Holick 2007, Holick 2017). Die meisten Experten definieren einen Vitamin-D-Mangel als 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von unter 20 ng/ml bzw. 50 nmol/l (Holick 2007, Bischoff-Ferrari et al. 2006), was jedoch bis dato für weltweiten Diskussionsbedarf sorgt: Im Laufe der letzten 15 Jahre gab es zahlreiche Vorschläge zur Redefinition des oberen Schwellenwertes des 25-OH-Vitamin-D₃-Mangel-Bereichs um eine mögliche Korrelation zwischen Vitamin-D-Status und anderweitigen Gesundheitsbeeinträchtigungen, zu denen nicht Rachitis und Osteomalazie zählen, berücksichtigen zu können (Sempos et al. 2018, Norman et al. 2007). Außerdem variiert in verschiedenen Ländern das Ausmaß der tatsächlichen Vitamin-D-Versorgung. Insbesondere in Europa kommen verhältnismäßig niedrige Vitamin-D-Spiegel in der Bevölkerung vor im Vergleich zu den USA (Sempos et al. 2012, van Schoor & Lips 2011). Unter Berücksichtigung letzteren Aspektes herrscht ebenfalls kein eindeutiger gemeinsamer Konsensus über die Antwort auf die Frage nach einer Definition der optimalen Vitamin-D-Versorgung (Sempos et al. 2018): Während das Institute of Medicine einen 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von 20 ng/ml für ausreichend hält (Ross et al. 2011), sind andere der Meinung, dass mindestens 30 ng/ml vorliegen sollten (Holick et al. 2017). Fest steht, dass ein 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von unter 10 ng/ml einen fortgeschrittenen klinisch-manifesten Vitamin-D-Mangel mit vorherrschenden muskuloskeletalen Beschwerden im Sinne von Frakturen, Knochenschmerzen, Muskelschwäche und

Skelettdeformierungen repräsentiert (van Schoor & Lips 2011, Bischoff-Ferrari et al. 2006). In einigen Teilen Europas und der USA wird der Bevölkerungsanteil mit einem Vitamin-D-Mangel (25-OH-Vitamin-D-Spiegel von <10 ng/ml) bzw. einer inadäquaten Vitamin-D-Versorgung (25-OH-Vitamin-D-Spiegel von 10-29 ng/ml) auf inzwischen 30%-50% geschätzt (Holick 2017). Etwa 63% der deutschen Bevölkerung leidet an einem Vitamin-D-Mangel (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., 13. DGE-Ernährungsbericht, Bonn (2016), S. 41–47). Da über 80% des individuellen Vitamin-D-Spiegels bei Kindern und Erwachsenen von der UV-Licht-induzierten endogenen Biosynthese von Vitamin-D abhängt, stellt eine unzureichende Sonnenlichtexposition die vorherrschende Ursache für einen Vitamin-D-Mangel dar (Holick 2007). Als wichtige Determinanten der Vitamin-D-Versorgung sollten zudem der Lebens- und Bekleidungsstil, eine genetische Prädisposition, das Ausmaß der Hautpigmentierung, die Ernährungssituation sowie medikamentöse Einflüsse berücksichtigt werden (Sempos et al. 2018, Holick et al. 2017).

2.2.4 Das humane Immunsystem

Als funktionelles Netzwerk aus lymphatischen Organen, verschiedenen Zelllinien, vielseitigen Signaltransduktionskaskaden und spezialisierten Effektormolekülen übernimmt das Immunsystem zahlreiche physiologische Aufgaben wie beispielsweise die Erkennung und konsekutive Eliminierung von Krankheitserregern oder fehlregulierten zellulären Prozessen sowie die Generierung einer effektiven Effektorantwort gegen den Störfaktor. Dabei können sowohl endogene als auch Umweltfaktoren zu einer Dysregulation dieses immunologischen Systems führen, welche oftmals die Ausprägung von Autoimmunreaktionen oder letztlich auch malignen Erkrankungen initiieren kann (Murphy & Weaver 2016). Es existieren zahlreiche Formen einer induzierten Immunreaktion: Eine Immunantwort kann über zelluläre oder humorale Mechanismen vermittelt werden; sie kann erreger- bzw. noxenspezifisch oder unspezifisch sein. Auch die Entwicklung einer immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen kann als Immunreaktion aufgefasst werden (Murphy & Weaver 2016). Eine erste mechanische bzw. biochemische Barriere gegen exogene Erreger bilden dabei die äußere Haut, die Schleimhäute, die Tränenflüssigkeit, die Abtransportfunktion durch Flimmerhärchen, die antimikrobiellen Speichelenzyme, die Magensäure und die Darmflora. Eine Gemeinsamkeit sowohl des spezifischen als auch des unspezifischen Immunsystems stellt die Untergliederung in jeweils einen humoralen (lösliche Faktoren) und zellulären Anteil dar.

2.2.4.1 Zelluläre Komponenten des menschlichen Immunsystems

Zu dem zellulären Anteil des spezifischen bzw. adaptiven Immunsystems zählen die heterogene Gruppe der im Knochenmark gebildeten T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, während beim angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystem die Granulozytenpopulationen, das Monozyten-Makrophagen-System, Mastzellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen die zelluläre Komponente ausmachen. Nachfolgend werden vordergründig die Lymphozytenpopulationen und antigenpräsentierenden Zelltypen besprochen, da diese für das Verständnis der vorliegenden Arbeit am bedeutsamsten sind. Demzufolge wird auf eine ausführliche Erklärung der anderen Zellpopulationen

an dieser Stelle verzichtet.

Im Thymus selektierte T-Zellen tolerieren Autoantigene und besitzen einen antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR) mit dem peptidbeladene MHC-Moleküle auf Zielzellen erkannt sowie gebunden werden können (Murphy & Weaver 2016). Der T-Zell-Aktivierungsprozess beginnt nachdem naive, reife T-Zellen aus dem Thymus mobilisiert in die Zirkulation gelangen und dort auf prozessierte Antigene in Form von MHC-Komplexen, präsentiert auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen, treffen, die den ersten Schritt der spezifischen T-Zell-Prägung (Priming) einleiten (Chen 2004). Die MHC-Komplex-TCR-Interaktion ist essentiell für eine T-Zell-Antwort, jedoch keineswegs ausreichend für eine komplette T-Zell-Aktivierung oder -Ausreifung. Um diesen Aktivierungsprozess vollständig zu durchlaufen sind zusätzlich co-stimulatorische sowie co-inhibitorische Signale notwendig (Chen & Flies 2013): In Abhängigkeit von der Ausprägung des Verhältnisses hemmender und stimulierender Einflüsse auf die T-Zelle kann es entweder zu einer T-Zell-Antwort, einer T-Zell-Anergie, einem Sistieren der Differenzierungsvorgänge oder gar zur Apoptose der betroffenen Zelle kommen (Murphy & Weaver 2016). Durch die Variabilität hinsichtlich der Glykoproteinausstattung auf der Zelloberfläche können T-Lymphozyten in charakteristische Subtypen und unterschiedliche Reifegrade eingeteilt werden: CD (Cluster of differentiation) -Moleküle der Klasse 4 finden sich auf T-Helfer-Zellen, die Immunreaktionen zentral koordinieren, indem T-Zell-rezeptorspezifische Antigene durch antigenpräsentierende Zellen auf MHC2-Komplexen der T-Helferzelle präsentiert werden (Murphy & Weaver 2016). Durch diese Interaktion kommt es zu einer Aktivierung der T-Helferzelle und konsekutiv neben einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zelllinie zu einer charakteristischen Zytokinausschüttung, resultierend entweder in einer humoralen B-Zell-vermittelten Immunantwort (TH2-Typ) oder einer TH1-polarisierten zellulären proinflammatorischen Immunreaktion (Murphy & Weaver 2016). Eine Gruppe CD4-, CD25-, und FOXP3-positiver regulatorischer T-Lymphozyten (TREG) mit überwiegend inhibitorischem Zytokinprofil und suppressiven Eigenschaften auf (überschießende) Immunreaktionen ist essentiell an Immuntoleranz-Prozessen und der Entwicklung einer Anti-Tumor-Immunität (Mandal et al. 2016, Ferris 2015) beteiligt. CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CTLs) dienen hauptsächlich der Eliminierung infizierter oder entarteter körpereigener Zellen. Die Unterscheidung zwischen Zielzellen und gesunden Zellen erfolgt dabei auf molekularer Ebene durch den Abgleich der Expressionsdichte von MHC1-Molekülen, die sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen endogenen Zellen befinden, und den daran im Komplex gebundenen antigenen Peptidfragmenten, die aus dem Zellinneren durch proteasomalen Abbau hervorgehen. Somit kann das Vorhandensein von erregerspezifischen Peptidfragmenten im MHC1-Komplex einen Erregerbefall der Zielzelle signalisieren und nach MHC1-Komplex-TCR-Interaktion die Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle initiieren. Dies führt konsekutiv zu einer Ausschüttung von Perforinen und Granzymen mit zytotoxischer, lytischer und apoptotischer Wirkung auf die Zielzelle (Murphy & Weaver 2016).

Zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) zählen im Wesentlichen die dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen. Letztere reifen aus hämatogen zirkulierenden Monozyten heran und kommen im Wesentlichen in peripheren Geweben vor um dort Pathogene oder exogene Schadstoffe zu erkennen und durch Phagozytose zu eliminieren: Als entscheidender Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr sind Makrophagen in der Lage exogene Antigene nach intrazellulären

Einleitung

Prozessierungsschritten oberflächlich in Assoziation mit MHC2-Komplexen zu präsentieren und konsekutiv durch Interaktion mit T-Zellen die Initiation einer antigenspezifischen Immunantwort zu triggern. T-Helferzellen unterstützen durch $\text{IFN-}\gamma$ die Makrophagenaktivierung. Ebenso sind Makrophagen an der Beseitigung von gealterten, apoptotischen bzw. zerstörten endogenen Zellpopulationen beteiligt (Murphy & Weaver 2016). Als Hauptproduzenten von tumor-nekrose-Faktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) agieren Makrophagen durch Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ proinflammatorisch, indem $\text{TNF-}\alpha$ weitere Makrophagen stimuliert, die Bildung von Akute-Phase-Proteinen fördert, die Migration neutrophiler Granulozyten beschleunigt und die Zellproliferation und Differenzierung von Immunzellen reguliert (Murphy & Weaver 2016).

Naive B-Lymphozyten gelangen nach einer Entwicklungsphase im Knochenmark mit Bildung eines funktionstüchtigen B-Zell-Rezeptors, welcher als membranständiger Antikörper fungiert, in die lympho-hämatogene Zirkulation und durchlaufen zur Aktivierung einen zweistufigen Prozess (Murphy & Weaver 2016): Zuerst wird das lösliche Fremdantigen mit dem B-Zell-Rezeptor gebunden um anschließend nach intrazellulärer Aufnahme und Prozessierung im membranständigen MHC2-Komplex präsentiert zu werden. Durch T-Helferzellen wird über eine TCR-MHC2-Komplex-Interaktion und konsekutive Zytokinsekretion eine Aktivierung der B-Zelle induziert. Die B-Zelle wird durch diese T-Zell-vermittelten Signale zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle angeregt. Entscheidend für die Antikörpervielfalt ist die somatische Rekombination von Gensegmenten im Rahmen des B-Zell-Reifungsvorgangs. Dadurch kann für nahezu jedes Pathogen ein spezifischer Antikörper gebildet werden. B- und T-Lymphozyten agieren als Modulatoren und Effektoren des Immunsystems, unterliegen aber einer engmaschigen funktionellen Kontrolle durch dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen (TREG): Hinsichtlich der immunologischen Toleranzentwicklung gegenüber körpereigenen Antigenen organisieren dendritische Zellen (DCs) bereits im Thymus Prozesse der T-Zell-Reifung (Murphy & Weaver 2016). Als APCs greifen die dendritischen Zellen im Rahmen der Initiierungsphase einer spezifischen Immunreaktion interventionell ein (Steinman 1991, Chen 2004). Anhand des variablen Expressionsmusters von membranassoziierten Molekülen kann zwischen reifen oder unreifen DCs differenziert werden, die sich im immunologischen Interaktionsverhalten, Migrationsvorgängen und antigenpräsentierenden Eigenschaften voneinander unterscheiden (Pletinckx et al 2011): Im Zuge des DC-Reifungsprozesses wird im Wesentlichen das Expressionsprofil von T-Zell-stimulierenden Rezeptormolekülen hochreguliert, die vor allem co-stimulatorisch auf naive T-Zellen in dem bereits beschriebenen T-Zellaktivierungsprozess mitwirken und bei weiteren sequenziellen Stufen der T-Effektor-Zell-Differenzierung regulierend eingreifen: Liganden der B7-Immunglobulin-Superfamilie auf APCs wie CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, B7-H3 oder B7-H4 interagieren hierbei mit Molekülen der CD28-Familie auf T-Zellen wie CD28, CTLA-4 oder PD-1 im Sinne einer Co-Stimulation oder Co-Inhibition der T-Zelle (Chen 2004, Zou 2005). Außerdem inhibieren TREGs die DC-Reifung durch eine B7-CTLA-4-Interaktions-vermittelte Induktion von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und induzieren über B7-CTLA-4-Interaktionen eine Herunterregulation der Co-Stimulatoren CD80/CD86. Diese T-Zell-induzierte Suppression dendritischer Zellen erfolgt über ein sogenanntes "reverse Signaling" (Zou 2005). Als Teil der angeborenen bzw. unspezifischen Immunabwehr bekämpfen die

CD56-positiven lymphozytären natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durch zytolytische Eigenschaften insbesondere physiologisch gestresste Zellen, wie Tumorzellen oder viral-infizierte Zellen, ohne antigenspezifische, somatisch rekombinierte Rezeptoren zu besitzen (Moretta et al. 2002). Die NK-Zell-Aktivität kann durch Zytokine, Pathogen-codierte Substanzen oder NK-Zellrezeptorliganden gesteigert werden, wobei das Verhältnis von aktivierenden zu hemmenden Rezeptoren die NK-Zell-Antwort entscheidend prägt (Moretta et al. 2002). Einige inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren binden MHC1-Moleküle der Zielzelle. Zellstressassoziierte Moleküle der Zielzelle können als Ligand für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, wie die Gruppe der KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) - Rezeptoren (Murphy & Weaver 2016), dienen. Die onkologische Transformation einer Zelle geht oft mit einem Verlust oder einer verminderten Expressionsdichte an MHC1-Molekülen auf der Zelloberfläche einher, sodass die aktivierenden Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen Tumor- und NK-Zelle überwiegen und somit eine zytotoxische Anti-Tumor-Antwort generiert werden kann. Dieses Phänomen wird als „Missing-self-Hypothese“ in der Immunbiologie bezeichnet (Murphy & Weaver 2016, Paul & Lal 2017). Durch Exozytose von Perforinen und Granzymen kommt es zur Zytolyse der Zielzelle. Durch die Sekretion von TNF- α und IFN- γ wird die unspezifische Immunantwort moduliert (Murphy & Weaver 2016).

2.2.4.2 Humorale Komponenten des menschlichen Immunsystems

Der humorale Anteil des adaptiven Immunsystems wird im Wesentlichen durch Immunglobuline (Antikörper) repräsentiert, die durch Plasmazellen produziert werden, während der entsprechende Teil des angeborenen Immunsystems hauptsächlich aus bakteriziden Faktoren wie Zytokinen, Lysozym, Defensinen, reaktiven Sauerstoffradikalen, Enzymen und dem Komplementsystem besteht (Murphy & Weaver 2016). Das Komplementsystem kann auf drei Wege, die sich im Wesentlichen in ihrem Grad der Antikörperabhängigkeit und des initialen Aktivierungsmechanismus unterscheiden, aktiviert werden. Einzelne Glykoproteinfragmente der Komplementkaskade bilden schließlich einen Membrane Attack Complex (MAC), eine Art Pore auf der Zielmembran des Pathogens, was in einem Lysevorgang resultiert. Bestimmte Antikörperklassen und Komplementfaktoren können pathogene Oberflächmoleküle für Immuneffektorzellen markieren. Dies wird als Opsonierung bezeichnet (Murphy & Weaver 2016). Im immunbiologisch-onkologischen Kontext sind unspezifische Modulatoren wie Interferone und Interleukine entscheidend (Chen & Mellman 2013). Einige Mediatoren wirken dabei chemotaktisch, locken also lokal Immunzellen an (Murphy & Weaver 2016).

2.2.5 Rolle von Vitamin-D im Bezug auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem

Die wichtige Bedeutung einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung für die Gesundheit konnte über die letzten Jahrzehnte durch Eruierung zahlreicher über die Regulation der Calciumhomöostase hinaus gehende Rollen von Vitamin-D bezogen auf verschiedene Erkrankungen des menschlichen Körpers bestätigt werden (Dankers et al. 2016, Bouillon et al. 2008, Zittermann 2006): Daten einer Meta-Analyse von randomisiert kontrollierten Studien konnten darlegen, dass eine regelmäßige Vitamin-D-Supplementierung unabhängig von der Todesursache die Gesamtmortalität um 7% signifikant

reduzieren konnte (Autier & Gandini 2007). Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts konnten anhand von Studien erste Erkenntnisse bezüglich einer potenziellen Assoziation zwischen dem Vitamin-D-Serumspiegel und dem Risiko einer malignen Tumorerkrankung gewonnen werden (Peller & Stephenson 1937, Apperly 1941) : Die erhobenen Daten führten zu der Hypothese, dass adäquate Sonnenexposition eine protektive Wirkung im Hinblick auf das Auftreten von Krebserkrankungen nicht dermatologischer Natur haben könnte - eine Assoziation die auch durch spätere Studien bestätigt werden konnte (Grant 2016, Moukayed & Grant 2017). In diesem Zusammenhang konnte in nachfolgenden prospektiven und retrospektiven Studien gezeigt werden, dass ein um 30%-50% erhöhtes Risiko für die Entstehung von Colon-, Prostata-, und Mammakarzinomen und eine höhere Mortalität dieser Tumorentitäten mit einem 25-OH-Vitamin-D-Spiegel unter 20 ng/ml einherging (Giovannucci et al. 2006, Feskanich et al. 2004, Garland et al. 2006). Diese Assoziation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und dem Tumorrisiko konnte auch bezüglich Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches bestätigt werden: Ein erniedrigter 25-OH-Vitamin-D-Spiegel korreliert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für HNSCCs und anderen Tabak assoziierten Tumorentitäten (Afzal et al. 2013, Fanidi et al. 2016, Moukayed & Grant 2017). Auffällig ist ebenso die beachtlich höhere Inzidenz eines Vitamin-D-Mangels unter HNSCC-Patienten (Orell-Kotikangas et al. 2012, Arem et al. 2011) im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Karzinom, was Studien an der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes ebenfalls zeigen konnten: Die 25-OH-Vitamin-D-Durchschnittswerte von Kontrollpatienten (Abb. 6A) waren fast doppelt so hoch wie die des Patientenkollektivs mit einem Kopf-Hals-Tumor (Abb. 6B). In der statistischen Auswertung lässt sich zwischen beiden Gruppen ein deutlicher Unterschied in der Vitamin-D-Versorgung erkennen (Abb. 6C). Interessanterweise hatten HNSCC-Patienten mit einem höheren Vitamin-D-Serumspiegel einen signifikant niedrigeren Lymphknotenbefall und ein signifikant längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu entsprechenden Patienten mit niedrigem Vitamin-D-Status (Abb. 6D)

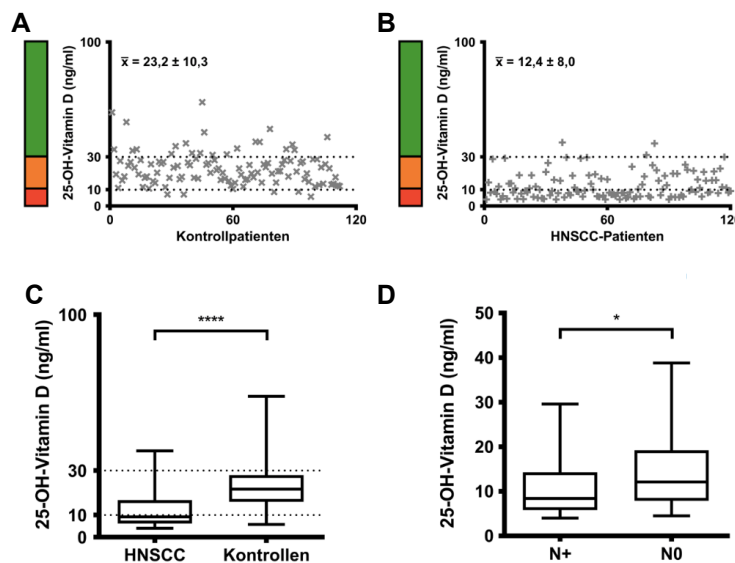


Abb. 6: **A** zeigt die Vitamin-D-Serumspiegel der Kontrollpatienten ($x = 23,2 \pm 10,3$) und **B** die Vitamin-D-Serumspiegel der HNSCC-Patienten ($x = 12,4 \pm 8,0$). **C** bildet die in **A** und **B** für die beiden Gruppen dargestellten Daten mithilfe von Boxplots ab, statistische Signifikanz: $p < 0,0001$ (****). **D** veranschaulicht die Unterschiede im Lymphknotenbefall bei unterschiedlichem Vitamin-D-Serumspiegel, statistische Signifikanz: $p = 0,0179$ (*) (modifiziert nach Bochen et al. 2018).

In vitro-Experimente an Kopf-Hals-Tumorzelllinien konnten darlegen, dass Vitamin-D anti-proliferative und angiogenesehemmende Wirkungen in dieser Tumorentität besitzt (Vuolo et al. 2012, Ben-Shoshan et al. 2007) sowie ein Zellzyklusarrest durch Expressionserhöhung von p21, p27 und p18 (Hager et al. 2001, Gedlicka et al. 2006) herbeiführen kann. Zudem wirkt eine *in vitro*-Behandlung mit Vitamin-D apoptotisch auf Kopf-Hals-Tumorzellen, induziert antiinflammatorische Prozesse und steigert die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (Chiang et al. 2013, Christakos et al. 2016, Ma et al. 2016). Ein weiterer essentieller Aspekt liegt in der Notwendigkeit eines ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegels für eine adäquate Funktionsfähigkeit des Immunsystems im Rahmen einer Anti-Tumor-Immunreaktion begründet (Walker et al. 2012, Young & Day 2013, Song et al. 2016), was Konsequenzen für den Erfolg und die Effizienz immuntherapeutischer Maßnahmen nach sich ziehen kann: Bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel konnte, im Rahmen einer onkologischen Antikörpertherapie mit Rituximab, eine verminderte NK-Zell-induzierte Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und eine schlechtere Patientenprognose beobachtet werden (Bittenbring et al. 2014). Im Rahmen der in der Kopf-Hals-Onkologie integrierten Immuntherapie mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab, sowie den Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab ist eine NK-Zell-vermittelte ADCC für das Therapieansprechen ebenso von entscheidender Relevanz (Winiarska et al. 2011). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) exprimieren und im Reifungsprozess auf Vitamin-D angewiesen sind (Yu & Cantorna 2008). Hinsichtlich der therapeutischen Relevanz von Vitamin-D konnte außerdem durch *in vitro*-Untersuchungen eine potenzierende Wirkung auf bestimmte Chemotherapeutika in einigen Tumorzelllinien festgestellt werden (Ma et al. 2008, Hershberger et al. 2002). Auf direkt endokrinem Wege als auch indirekt über veränderte antigenpräsentierende Eigenschaften von APCs moduliert aktives Vitamin-D die T-Zell-Homöostase (Priehl et al. 2013). Im Wesentlichen resultiert dies in einem toleranteren Immunstatus, da proinflammatorische Einflüsse minimiert werden: Zum Einen ist das Zytokinprofil Vitamin-D-exponierter T-Zellen charakterisiert durch eine gesteigerte Produktionsrate antientzündlicher Mediatoren wie beispielsweise IL-10 und IL4 wohingegen die Sekretion inflammatorischer Marker wie TNF- α oder IL-2 runterreguliert wird (Boonstra et al. 2001). Zum Anderen werden vermehrt TREGs aktiviert sowie deren Genexpression gesteigert (Baeke, Takiishi et al. 2010). Ergebnisse einer Metaanalyse aus dem British Journal of Cancer (n = 44.165, 64 Studien), implizieren, dass ein höherer Vitamin-D-Spiegel das Gesamtüberleben bei einem Tumorleiden positiv beeinflusst (Hazard Ratio: 0,74; Vaughan-Shaw et al. 2017).

Zusammenfassend veranschaulichen diese Daten, dass Vitamin-D die immunologische Potenz sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems bei Gesunden und Tumorpatienten positiv zu beeinflussen vermag (Kongsbak et al. 2014, Priehl et al. 2013, Bouillon et al. 2008).

2.3 Assoziation zwischen dem Immunsystem und Krebserkrankungen

2.3.1 Komponenten einer Anti-Tumor-Immunreaktion

Im Vergleich zu gesunden endogenen Zellen wird eine entartete Zelle aufgrund der tumorassoziierten Mutationslast sowie des variablen Molekülexpressionsprofils durch ein modifiziertes Antigenespektrum (sogenannte Neoantigene) von Immunzellen und Antikörpern als potentielle Zielstruktur erkannt und durch zytotoxische Effektormechanismen bekämpft (Ferris 2015, Mandal et al. 2016). Tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene werden über einen membranständigen MHC1-Komplex auf der Tumorzelle präsentiert, sodass zytotoxische T-Lymphozyten diese über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen und die Tumorzelle bekämpfen können. APCs präsentieren nach Aufnahme und Antigenprozessierung tumorassoziiierter bzw. tumorspezifischer Antigene diese über einen MHC2-Komplex an T-Zellen um diese zu aktivieren. Weiterhin sind natürliche Killerzellen (NK) nach dem Prinzip der „Missing-self-Hypothese“ in der Lage entartete Zellen, durch das modifizierte und oftmals runterregulierte MHC1-Expressionsprofil, zu erkennen und zu eliminieren. Neben diesen zellulären Interaktionsphänomenen sind Zytokin- oder Chemokin-vermittelte Vorgänge im lokalen Tumorumfeld, der sogenannten Tumormikroumgebung, entscheidend für eine effektive Immunreaktion. Zahlreiche biologische Vorgänge, sowohl immunstimulierender als auch immunsuppressiver Natur, modulieren dabei die Immunreaktion gegen den Tumor. Eine Übersicht über die an der Anti-Tumor-Immunantwort beteiligten Prozesse gibt Abbildung 7.

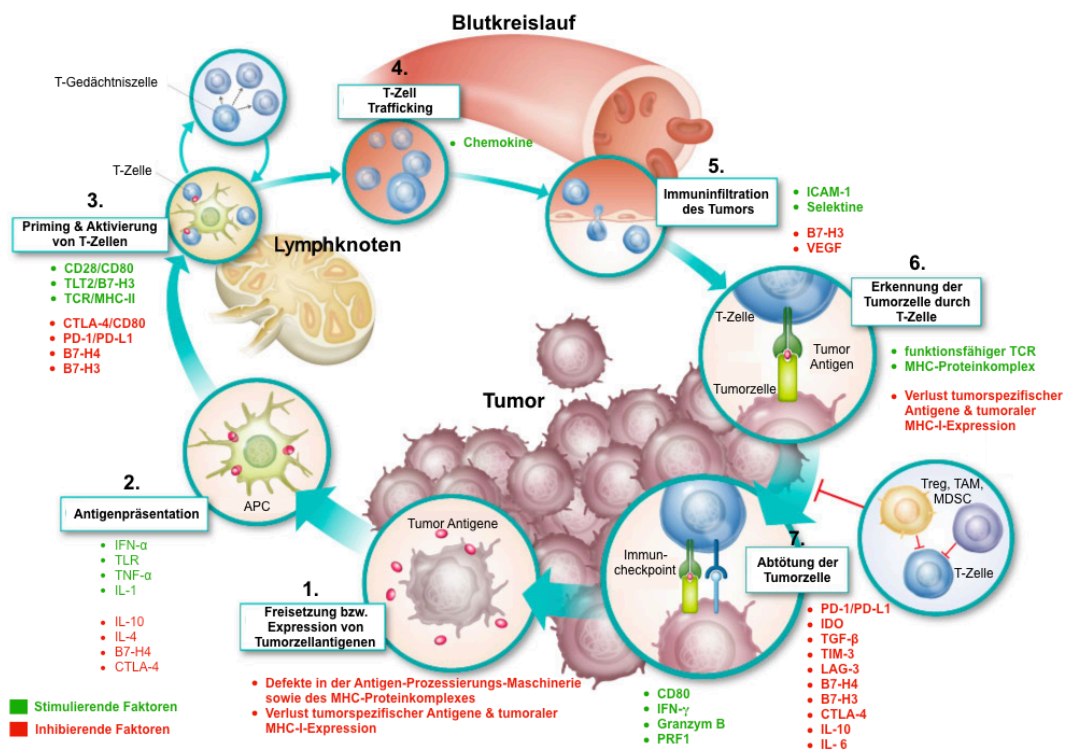


Abb. 7: Komponenten einer Anti-Tumor-Immunreaktion (modifiziert nach Chen & Mellman, 2013): Tumorzellen exprimieren tumorspezifische bzw. tumorassoziierte Antigene an der Zelloberfläche oder setzen diese frei (1). In Folge nehmen antigenpräsentierende Zellen (APC) entsprechende Antigene auf und präsentieren diese nach intrazellulärer Prozessierung auf deren Zelloberfläche (2). Diese Zellen wandern in die nächstgelegenen Lymphknoten, um dort die

Einleitung

Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von naiven T-Zellen zu initiieren (3). Unter Einfluss weiterer Immunzellinteraktionen beginnen sich diese antigenspezifischen T-Zellen zu gruppieren und nach Bedarf und Funktionalität weiter zu differenzieren (3,4). Diese treten dann in die Blutzirkulation ein, um zum Tumorgewebe zu gelangen (4). Es kommt im Tumor zu einer Infiltration von T-Zellen und weiteren Immunzellen (5). Tumorzellen, die ein bestimmtes Antigen exprimieren werden von antigenspezifischen T-Zellen durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen erkannt (6). Es kommt zu einer Abtötung der Tumorzellen durch T-Zellen (7), was wiederum zu einer Freisetzung von tumorassoziierten bzw. tumorspezifischen Antigenen führt (1).

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Tumor im Körper bildet, hängt im Wesentlichen davon ab, ob das menschliche Immunsystem die entarteten Zellen als potentielle Gefahr erkennt und angreift (Abb. 7). Durch eine kontinuierlich aktive Immunüberwachung wird die Progressivität der Tumorerkrankung reduziert, indem heranwachsende Tumorzellen zerstört werden bevor sich eine solide Tumorzellformation bilden kann. Zudem können Immunüberwachungsprozesse selektiven Druck auf Tumorzellen ausüben, was konsekutiv im Sinne eines selektiven Vorteils bestimmter Tumorzellpopulationen durch anpassendes Immunediting, also der Aneignung von überlebensfördernden Mutationen und zellbiologischen Veränderungen, zu einer Evasion aus der immunologischen Kontrolle befähigt (Mittal et al 2014). Dies geschieht durch Reduktion der inhärenten Immunogenität, durch Maskierung und Modulierung tumorspezifischer Antigene und durch aktive Suppression von Signalen der Anti-Tumor-Immunreaktion. Des weiteren können dysregulative Vorgänge im Immunsystem oder die Akquisition tumorfördernder Faktoren bzw. molekularbiologischer Modifikationen in transformierten Zellen eine immunologisch entkoppelte Progression der Tumorzelle ermöglichen und somit die Manifestation einer Tumorerkrankung beschleunigen (Ferris 2015). Als vorwiegend immunsuppressive Krebserkrankung sind HNSCCs charakterisiert durch niedrigere absolute Lymphozytenzahlen im peripheren Blut (Kuss et al. 2004), beeinträchtigte NK-Zell-Funktion (Bauernhofer et al. 2003, Dasgupta et al. 2005), mangelhafte antigenpräsentierende Eigenschaften (López-Albaitero et al. 2006, Ferris 2015) und eine eingeschränkte Anti-Tumor-Aktivität von tumorinfiltrierenden T-Zellen (Mandal et al. 2016) im Vergleich zu gesunden Probanden. Kopf-Hals-Tumorzellen sind in der Lage die MHC1-Expression durch Mutationen in HLA-Allelen sowie in Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie (Ferris 2015, López-Albaitero et al. 2006) zu modifizieren und runterzuregulieren, was mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist, da dadurch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort beeinträchtigt wird (Mandal et al. 2016, Concha-Benavente et al. 2016, Abb. 7). Allerdings dient die Verminderung der MHC1-Expression auf der Tumorzelloberfläche als Trigger für eine NK-Zell-Aktivierung nach dem Prinzip der „Missing-self-Hypothese“ und daher vermeiden Tumorzellen einen kompletten Verlust von MHC1-Molekülen durch Aufrechterhaltung einer niedrigen MHC1-Expression bei gleichzeitiger Modifikation von Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie (Murphy & Weaver 2016). Das in HNSCCs hochkomplexe inflammatorische Zytokinmilieu kann zur Formierung bzw. Infiltration immunsuppressiver Zelltypen wie Tumorassoziierten Makrophagen (TAM), myeloiden Suppressorzellen (MDSC) oder regulatorischen T-Zellen (TREG) im Tumorgewebe beitragen. Diese Zellen können die Tumorprogressivität fördern sowie die Aktivierung von NK-Zellen und APCs hemmen (Mandal et al. 2016, Chen & Mellman 2013, Abb. 7).

2.3.2 Rolle der Immun-Checkpoint-Moleküle in der Kopf-Hals-Onkologie

Die Grundvoraussetzung immuntherapeutischer Therapieansätze in der Onkologie ist, dass Tumorgewebe vom Immunsystem als körperfremd erkannt und konsekutiv bekämpft bzw. eliminiert werden kann. Interaktionen zwischen Immun-Checkpoint-Molekülen können in Bezug auf eine Immunreaktion sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkungen auf die Zielzellen haben (Abb. 7) und steuern zelluläre Immunantworten physiologischer und pathophysiologischer Natur. Im Zuge physiologischer Immunreaktionen limitieren Interaktionen zwischen immuninhibierenden Immun-Checkpoint-Molekülen überschießende Immunantworten im Hinblick auf Ausmaß und Dauer, um vor autoimmuner Reaktivität sowie vor exzessiv inflammatorischen Gewebeprozessen zu schützen (Davis et al. 2016). Auch die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten wird durch Co-stimulatorische Signale über stimulierende Immun-Checkpoint-Moleküle vermittelt (Abb. 7). Auf der anderen Seite werden Tumorekurrenz und Metastasierung von HNSCCs durch Immunevasionsmechanismen begünstigt, an denen sich immuninhibierende Immun-Checkpoint-Moleküle entscheidend beteiligen (Mandal et al. 2016, Ferris 2015): Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen werden in der Tumormikroumgebung vom Tumor ausgenutzt um aktive T-Effektor-Lymphozyten funktionslos zu machen, Reifungs- bzw. Aktivierungsprozesse von T-Zellen einzuschränken oder eine effektive Antigenpräsentation zu unterbinden, sodass in der Folge eine wirkungsvolle immunologische Kontrolle der Tumorprogression erschwert wird (siehe Abb. 7 und Abb. 8).

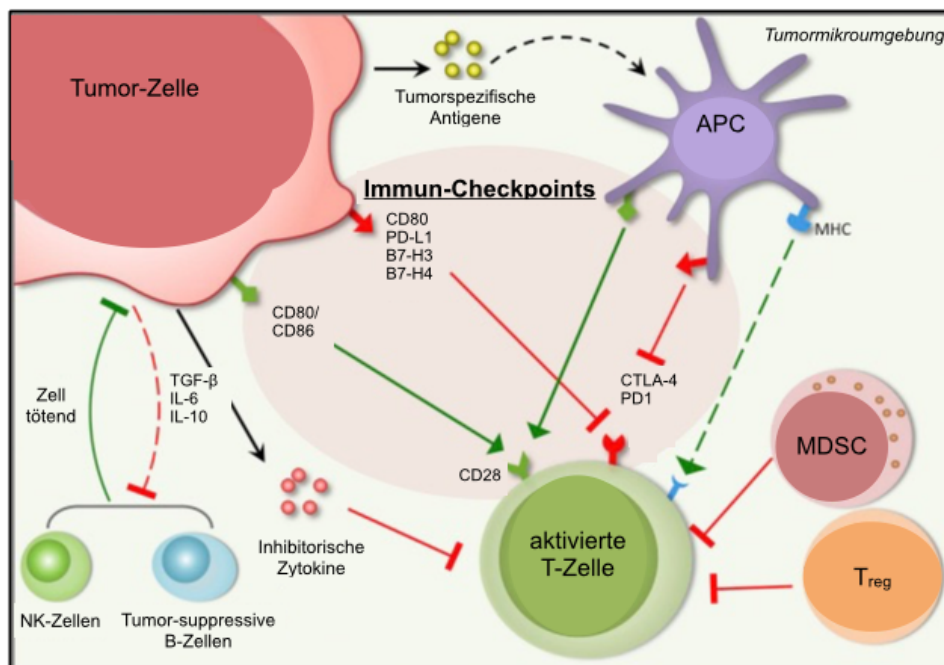


Abb. 8: Cross-Talk zwischen Tumorzellen und Immunzellen in der Tumormikroumgebung (modifiziert nach Lin et al. 2016): Effektoren einer Anti-Tumor-Immunreaktion sind im Wesentlichen aktivierte Tumor-spezifische T-Zellen und NK-Zellen. Tumorzellen sind in der Lage, durch einer gesteigerten Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen, die Ausschüttung von inhibitorischen Zytokinen, eine Unterstützung immunsuppressiver Effekte von TREGs und myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) sowie eine NK-Zell-Hemmung die Anti-Tumor-Immunantwort zu unterdrücken. Diese hemmenden Eigenschaften der Tumorzellen bilden in der Tumormikroumgebung mit anderen Zelltypen ein komplexes immunsuppressives Netzwerk.

Dabei sollte berücksichtigt werden, dass zum einen zahlreiche Immun-Checkpoint-Moleküle mehrere verschiedene Zielrezeptoren oder Liganden mit unterschiedlichen funktionellen Implikationen besitzen (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Weiterhin können bestimmte Immun-Checkpoint-Moleküle auf Tumor- und Immunzellen variabel exprimiert werden und müssen daher kontextabhängig interpretiert werden (siehe Abb. 7 und Abb. 8). So können nicht nur Tumorzellen, sondern auch immunsuppressive Zellpopulationen wie TREGs und MDSCs über inhibierende Immun-Checkpoint-Moleküle den Aktivierungszustand von T-Effektorzellen und APCs beeinflussen (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Die immunsuppressive Eigenschaft tumorassoziierter TREGs wird im Wesentlichen über CTLA-4 vermittelt (Davis et al. 2016, Chen et al. 2017).

CD80, welches auf Tumorzellen, Makrophagen und einigen Lymphozytenpopulationen vorkommt (Chen 2004), agiert je nach Zielrezeptor co-stimulatorisch via CD28 oder co-inhibitorisch via CTLA-4 auf T-Zellen (Chen & Flies 2013, Abb. 8). Gerade das Priming CD4-positiver T-Zellen im lymphatischen Gewebe wird über CTLA-4 eingeschränkt. Niedrige tumorale CD80-Spiegel begünstigen eine Immunevasion durch präferentielle Bindung von CTLA-4, da aus der um einer Log-Stufe höheren Affinität von CTLA-4 zu CD80 einen kompetitiver Vorteil gegenüber CD28 resultiert (Chen 2004, Tirapu et al. 2006).

PD-L1 (Programmed death-ligand 1), welches neben dem Vorkommen auf aktivierten T-Lymphozyten und einigen APCs, in HNSCCs und weiteren Tumorentitäten überexprimiert ist (Zandberg & Strome 2014), induziert über PD-1 einen Funktionsverlust bzw. eine Apoptose von T-Zellen verschiedenster Subtypen (Zou 2005, Abb. 8). Proinflammatorische Zytokine können im peripheren Gewebe eine gesteigerte PD-L1 Expression herbeiführen (Murphy & Weaver 2016).

B7-H3 (CD276), ein sowohl co-stimulatorisches als auch co-inhibitorisches Molekül, reguliert die Aktivität von T-Lymphozyten und NK-Zellen sowie die Zytokinproduktion von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen durch Interaktion mit einem nicht eindeutig charakterisierten induzierbaren Zielrezeptor (Chen 2004, Abb. 8). B7-H3-mRNA kommt in vielen peripheren Geweben vor (Schildberg et al. 2016, Yi & Chen 2009). Aufgrund der geringen Proteinexpression in einem physiologischen Setting, spielt B7-H3 zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase eine eher untergeordnete Rolle im Vergleich zu CTLA-4 und PD-L1. Eine hohe zelluläre B7-H3 Proteinexpression kann auf Tumor- und tumorassozierten Zellpopulationen beobachtet werden (Yi & Chen 2009).

B7-H4, ein weiteres inhibitorisches Checkpoint-Molekül, welches vor allem auf Tumorzellen, APCs und tumorassozierten Immunzellen vorkommt (Chen 2004, Abb. 8), hemmt die Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen und verhindert somit eine Zytotoxizitätsentwicklung gegen tumorassozierte Antigene (Zou 2005). TREGs oder Tumorzellen ermöglichen durch Produktion von IL-6 oder IL-10 eine Induktion der B7-H4-Expression auf Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) oder antigenpräsentierenden Zellen was deren suppressive Potenz steigert (Kryczek et al. 2006).

Bestimmte über Immun-Checkpoint-Moleküle vermittelte Immunescapestrategien können durch die therapeutische Verwendung von sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren unterbrochen werden.

Hierbei handelt es sich um Antikörper gegen bestimmte Immun-Checkpoint-Rezeptoren oder Liganden die sich auf der Oberfläche von Tumor- oder Immunzellen befinden (Topalian et al. 2015, Qi et al. 2017): Immunsuppressive Ligand-Rezeptor-Interaktionen, die eine reduzierte T-Zell-Funktion herbeiführen können, werden so gezielt blockiert, sodass in der Folge eine Wiederherstellung der ursprünglichen T-Zell-Effektorfunktion gewährleistet werden kann. Dazu kommt, dass durch antikörpervermittelte Opsonierung eine Phagozytose oder eine Komplementsystem-vermittelte Lyse von betroffenen Tumor- bzw. T-Zellen erfolgen kann (Murphy & Weaver 2016). Dadurch können inaktive bzw. tumortolerierende oder immunsuppressive T-Zellen aus dem Körperkreislauf eliminiert, sodass folglich die Expansion neuer tumorspezifischer T-Zellen begünstigt werden kann (Corse et al. 2012, Nguyen et al. 2015).

Aktuelle Studien prüfen die Wirksamkeit von Ipilimumab, einem monoklonalen Antikörper gegen CTLA-4 der im Rahmen des malignen Melanoms seit 2011 erfolgreich eingesetzt wird, an fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren (Qi et al. 2017). Nivolumab und Pembrolizumab, zwei gegen PD-1 gerichtete therapeutische Antikörper, sind bereits zur Behandlung von fortgeschrittenen platinrefraktären HNSCCs zugelassen (Wollenberg 2019).

Es bleibt abzuwarten, wie Studienergebnisse zur kombinierten Immun-Checkpoint-Blockade durch Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Achse und CTLA-4-Inhibitoren (EAGLE Studie, KESTREL Studie) bei Kopf-Hals-Tumoren ausfallen werden. Beim malignen Melanom zeigten sich diesbezüglich bereits vielversprechende Zwischenergebnisse. Im Kontext einer kombinierten Immun-Checkpoint-Blockade soll folgendes erreicht werden: CTLA-4 und PD-1 können komplementäre Wirkungen auf T-Effektor-Zellen haben, da CTLA-4 primär einen hemmenden Effekt auf frühe Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse ausüben kann, während PD-1 die Effektorfunktion modulieren kann. Durch Blockade dieser beiden Signalwege fällt der synergistische Effekt auf die T-Zell-Aktivität stärker aus, sodass möglicherweise ein breiteres Patientenspektrum von einer solchen Behandlung profitieren könnte (Economopoulou et al. 2016).

2.4 Eigene Fragestellung

Nach der Zulassung des gegen den EGFR gerichteten chimären monoklonalen Antikörpers Cetuximab im Jahre 2006 und weiteren Optimierungen strahlen- bzw. chemotherapeutischer Maßnahmen konnte die bis dato immer noch ungünstige Prognose der Kopf-Hals-Tumore und das Ausmaß therapeutischer Toxizität bzw. Nebenwirkungen nicht wesentlich verbessert werden (Ramos et al. 2010). Der Langzeiteffekt einer Therapie mit den erst kürzlich zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab auf das Gesamtüberleben der Patienten in der klinischen Praxis bleibt noch abzuwarten. Als große Herausforderung aktueller wissenschaftlicher Forschung erweist sich die Suche nach neuen wirksamen Therapiemöglichkeiten mit prognoseverbessernden Eigenschaften und einem geringeren Nebenwirkungsspektrum. In der heutigen Ära der personalisierten zielgerichteten Immuntherapie bleibt es ein vielversprechender Ansatz durch Modulation des humanen Immunsystems die Tumorprogression zu verhindern. Als problematisch erweist sich in diesem Zusammenhang allerdings die Immundefizienz, welche bei der Mehrzahl der Kopf-Hals-Tumor-

Patienten in ausgeprägter Form vorliegt. Hinzu kommen funktionelle Auffälligkeiten des Immunsystems dieser Patienten, zu denen neben einem immunsuppressiven Milieu auch zahlreiche zelluläre Ausreifungsstörungen zählen (Kuss et al. 2004, Dagupta et al. 2005, López-Albaitero et al 2006). Zukünftig wird insbesondere für die Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapiestrategien eine molekulare Betrachtungsweise notwendig um zelluläre Interaktionsphänomene besser zu verstehen und neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) leiden häufig an einem prognostisch ungünstigen Vitamin-D-Mangel, welcher mit einer reduzierten antitumoralen Immunaktivität sowie einem negativen HPV-Status assoziiert ist (Bochen et al. 2018). Interaktionen zwischen Immun-Checkpoint-Molekülen limitieren im physiologischen Zusammenhang überschießende Immunreaktionen um vor autoimmuner Reaktivität oder exzessiv inflammatorischen Gewebeprozessen zu schützen. Viele dieser Signalwege werden von HNSCC-Zellen als Immunescape-Mechanismen ausgenutzt, indem vor allem die T-Zell-Aktivität moduliert wird. Hierdurch entsteht ein überwiegend immunsuppressives Tumormikromilieu, welches tumorprogressions-fördernd wirkt (Mandal et al. 2016). Da Vitamin-D sowohl immunregulatorische als auch antikanzerogene Eigenschaften aufweist (Bochen et al. 2018, Young & Day 2013) und HPV-positive Tumore durch eine gesteigerte Immunzellinfiltration gekennzeichnet sind (Partlová et al. 2015), stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob der Vitamin-D- bzw. HPV-Status von Kopf-Hals-Tumor-Patienten bestimmte Immun-Checkpoint-Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen beeinflussen könnte. Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand vor diesem Hintergrund darin den Einfluss von Vitamin-D und HPV auf das Expressionsverhalten der Immun-Checkpoint-moleküle CD80, B7-H3, B7-H4 und PD-L1 sowie des Proteinkomplex MHC1 in HNSCCs zu untersuchen. Dazu wurden zum einen immunhistochemische Färbungen an FFPE (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe)-Tumorgewebeprobe, welche von Patienten mit Vitamin-D-Mangel und Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung stammten, anhand eines im Vorfeld etablierten Versuchsprotokolls durchgeführt. Weiterhin wurde die Immun-Checkpoint-Molekülexpression in der HNSCC-Zelllinie FaDu mittels proteinbiochemischer Methoden analysiert um so eine Grundlage für weiterführende funktionelle Analysen zu schaffen.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Herstellernachweis

3.1.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die in den Versuchen verwendeten Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller / Herkunft
RK1101 Reiskocher	Tefal S.A.S, Rumilly, Frankreich
REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED	Dako GmbH, Glostrup, Dänemark
Rotationsmikrotom SM2400; Rotationsmikrotom RM2125RT	Leica Microsystems, Wetzlar
SuperFrost Plus Objektträger; Superfrost UltraPlus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort; Tischkühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Flasche T75, Cell+, Art. 83.3911	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex-Mixer (Genie2™)	Scientific Industries, Bohemie New York, USA
Filterpapier, DE81	Schleicher und Schüll, Dassel
Feinwaagen BP 61, BP 4100	Sartorius, Göttingen
Durchlichtmikroskop, 4316184	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Einbettungsgerät, Histocentre2	Thermo Shadon GmbH, Frankfurt a.Main
Wärmeschrank, Incucell	MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Gilson-Pipetten	Abimed, Düsseldorf
Deckgläser	R. Langenbrick, Emmendingen
Mikrowelle, Dimension 4	Panasonic, Hamburg
Wasserbad, Medax Typ WB24	Medax Nagel GmbH, Kiel
Reagens-Transfer-Prozessor, Tissue-Tek®VIP™5 Jr	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal
pH-Meter, pH 197	WTW, Weilheim
BX61 Fluoreszenzmikroskop	Olympus K. K., Tokio, Japan

Material und Methoden

Forma™ Series II 3110 CO ₂ -Inkubatoren	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Microflow biological safety cabinet class 2, M 5142615	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Brutschränke, Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
LUNA™ Automated Cell Counter L10001	Logos Biosystems, Annandale, Virginia, USA
LUNA™ Cell Counting Slides L12001	Logos Biosystems, Annandale, Virginia, USA
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Parafilm M	American National Can, Neenah, USA
Elektrophoresekammern (Eigenbau)	Werkstatt Biochemie 1, Göttingen
Immobilon-P Transfermembran (PVDF, 0,45µm Porengröße), IPVH00010	Merck, Darmstadt
Trans-Blot Cell-Apparatur	BioRad, München
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging, Göttingen

3.1.2 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Chemikalie	Hersteller /Herkunft
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken; Art. 09208831
Ethanol	Merck, Darmstadt; Art. 8187601000
Beta-Mercaptoethanol	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 21985023
Methanol	Merck, Darmstadt; Art. 1060091000
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. A9418
Trizma® base	Sigma, USA; Art. 061M5400V
L-Cystein Hydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. C6852
Papain	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA; Art. LS003126
DNase I (Desoxyribonuklease I)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. DN25
Trypsin inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. T9253
PBS pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 10010023
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. MHS32-1L

Material und Methoden

Entellan	Merck, Darmstadt; Art. 1.07961.0500
EDTA (Tetraethylendiaminoessigsäure)	Merck, Darmstadt; Art. 324503
H ₂ O _{bidest}	B.Braun, Melsungen; Art. 0082479E
HCL	Merck, Darmstadt; Art. 109057
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt; Art. 106467
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. F7524
Trypanblau	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
Trypsin (0,25%) /EDTA (0,2%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. T4049
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. P3444-100ML
DPBS (Dulbecco's PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art.D8537-1L
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GlutaMAX™	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt; Art.31966047
Accutase®	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. A6964-100ML
TrypLE™ Select	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 12563011
TBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art.T5912-1L
Tween®20	Merck, Darmstadt; Art. 817072
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt; Art. 108122
NP-40	Merck, Darmstadt; Art. ELCR1DC15
PageRuler™ prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 26616
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Art. 10077
Bisacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Art.1068101
AMPS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. 282731
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Art. 3593002
Glycerin 87% reinst,	Merck, Darmstadt; Art. 1040912500
Glycin kristallin	Merck, Darmstadt; Art. 500190
Tris-aminomethan	Merck, Darmstadt; Art. 108382
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven

3.1.3 Primärantikörper

Die zu untersuchenden Zielproteine im Rahmen der immunhistochemischen und molekularbiologischen Experimente wurden mithilfe eines primären Antikörpers auf Zellen identifiziert. Zur immunologischen Detektion der mittels Primärantikörper gebundenen Strukturen dienten entsprechende Sekundärantikörper, welche zum Teil auch fluoreszierende Eigenschaften aufwiesen. Die nachfolgende Tabelle 3 stellt eine Übersicht über die in den Versuchen verwendeten primären Antikörper dar.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben

IHC (Immunhistochemie), WB (Western Blot)

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
B7-H3 (CD276)	Monoklonal	Maus; clone MM0104-20J12 Abcam, England Art. ab89133	1:50 (IHC) 1:250 (WB)
MHC1	Monoklonal	Maus; W6/32 ThermoFisher, USA Art. MA5-11723	1:50 (IHC) 1:100 (WB)
CD80	Monoklonal	Maus; clone 2A2 Abcam, England Art. ab86473	1:3000 (IHC) 1:1000 (WB)
PD-L1	Monoklonal	Maus; clone ABM4E54 Abcam, England Art. ab210931	1:4000 (IHC) 1:1000 (WB)
B7-H4	Monoklonal	Maus; Clone H74 Abcam, England Art. ab110160 (IHC); Art. ab171280 (WB)	1:600 (IHC) 1:250 (WB)
β-Aktin	Monoklonal	Maus; ThermoFisher, USA Art. MA5-15739	1:5000 (WB)

3.1.4 Sekundärantikörper

Im Zuge der immunhistochemischen Analysen wurde als Detektionssystem für die von primären Antikörpern gebundenen Zielstrukturen das „Dako REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED“ entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Als Sekundärantikörper zur immunologischen Detektion der gebundenen Primärantikörper im Rahmen der Zellkulturversuche (Western Blot) diente der Cy-Fluorophor-gekoppelte Antikörper Anti-Maus-IgG-Cy3 (C2181-1ML, Verdünnung 1:2500, affinitätsgereinigt) der von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen wurde.

3.1.5 Zelllinien

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimente wurden die käuflich erworbene etablierte HNSCC-Zelllinie FaDu (DSMZ-Nr. ACC-784), die Zervixkarzinomzelllinie HeLa (DSMZ-Nr. ACC-57) sowie die Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 (DSMZ-Nr. ACC-115) verwendet. Die FaDu-Zelllinie entstammt von einem 56-jährigen Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Bereich des Hypopharynx, während die MCF-7-Zelllinie von einer 69-jährigen Patientin mit einem invasiv duktalem Mammakarzinom mit Her2/neu-Überexpression und positivem Progesteron- und

Östrogenrezeptorstatus isoliert wurde. Die HeLa-Zelllinie wurde von einer 67-jährigen Patientin mit Zervixkarzinom isoliert.

3.2 Immunhistochemische Analysen

3.2.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt eine qualitative und quantitative immunologische Methode dar, um mit Hilfe von Antikörpern Proteine in histologischen Gewebeschnitten zu lokalisieren und sichtbar zu machen. Das Grundprinzip des Antigen-Nachweises beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem spezifischen Molekülabschnitt des gesuchten Antigens, dem Epitop, im Sinne einer immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktion. In dieser Arbeit wurde das Prinzip der indirekten Immunhistochemie mit enzymatischem Nachweis angewendet. Dieses Detektionssystem besteht aus Sekundärantikörper, Enzymkonjugat und Substrat/Chromogen und soll zweierlei erreichen: Zum Einen sollte die Präsenz des gebundenen Primärantikörpers im Präparat als visuelles Signal gekennzeichnet werden, zum Anderen der Detektionsvorgang ausreichend verstärkt werden, damit im Idealfall eine solide Differenzierbarkeit des detektierten Signals am Ort des Epitops gegenüber potentiell unspezifischen Signalen im umgebenden Gewebe ermöglicht wird. Zur immunhistochemischen Analyse durch Antikörper kann fixiertes Gewebe im Sinne von am Mikrotom hergestellten Gewebeschnitten verwendet werden, wie es auch im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit erfolgte. Die Fixierung in Formalin und die anschließende Dehydrierung und Einbettung der Gewebestücke in Paraffinwachs haben eine strukturelle Modifikation der Antigene mit Proteinquervernetzung zur Folge, welches die Immunreaktivität der entsprechenden Antigene reduziert. Durch eine Antigendemaskierung kann dieser Vorgang teilweise rückgängig gemacht werden. Integraler Bestandteil dieses hitzeinduzierten Demaskierungsprozesses stellt die Inkubation in einem Retrieval-Puffer dar, wobei eine Hydrophilisierung der Gewebepreparate, zwecks Zugänglichkeit für wässrige Lösungen im Rahmen der anschließenden Immunfärbung, diesem Demaskierungsschritt vorausgeht. Der genaue Ablauf der immunhistochemischen Färbungen ist in den folgenden Kapiteln im Detail beschrieben.

3.2.2 Gewebepreparation und Fixierung

Bei der Entnahme des Patientengewebes wurden die Proben in PBS-gepuffertem 4%-igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, sodass am Ende FFPE (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe) -Gewebeproben zur Verfügung standen. Der Einbettungsprozess fand durch Zuhilfenahme des Reagenz-Transfer-Prozessors Tissue-Tek®VIP™5 JR, wie in Tabelle 4 aufgeführt, automatisiert statt.

Tabelle 4: Zyklen der Gewebepräparation mit Hilfe des Reagenz-Transfer-Prozessors Tissue-Tek®VIPTM5 Jr zur Einbettung in Paraffin.

Reagenz	Dauer [h]	Temperatur [°C]
4%-iges Formalin/1xPBS	2,0	45
70%-iges Ethanol	0,5	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
96%-iges Ethanol	0,5	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Paraffin	0,5	60
Paraffin	0,5	60
Paraffin	1,0	60
Paraffin	1,0	60

Im Anschluss an die in Tabelle 4 beschriebenen Zyklen erfolgte der weitere Einbettungsprozess manuell durch Nutzung des Einbettungsgeräts. Die dadurch hergestellten Blöcke aus Paraffinwachs wurden im nächsten Schritt durch ein Rotationsmikrotom bearbeitet. Hierbei wurden zunächst drei Schnitte zu je 10 µm Dicke verworfen und im Anschluss daran erfolgte eine Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten. Diese Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad unter Nutzung eines Pinsels gestreckt um anschließend auf Superfrost Plus bzw. Superfrost Ultra Plus Objektträger übertragen zu werden. Die fertigen Schnitte wurden in einem Inkubator bei 37°C über Nacht getrocknet.

3.2.3 Versuche zur Etablierung der Standardfärbeprotokolle

Für jede untersuchte Gewebeprobe wurden zur morphologischen Kontrolle parallel zur immunhistochemischen Färbung Hämatoxylin-Färbungen im Sinne einer morphologischen Kontrolle unter Verwendung eines Standardprotokolls angefertigt. Die Grundlage für die antikörperspezifischen Standardprotokolle bildete ein immunhistochemisches Färbeprotokoll von Florian Bochen, M.Sc. (Forschungslabor der Klinik für Hals-/Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes), welches durch Modifizierung einzelner Teilschritte an das zu untersuchende Versuchsmaterial adaptiert wurde. Letztlich konnten dadurch spezifische immunhistochemische Färbeprotokolle für die einzelnen Antikörper etabliert werden. Zusätzlich wurde bei jeder

immunhistochemischen Färbung eine Positivkontrolle eines bekannten Tonsillen- oder HNSCC-Präparats zur Überprüfung eines positiven Färbeergebnisses mitgeführt. Tonsillenpräparate wurden verwendet, um ein möglichst umfassendes Spektrum verschiedenster Immunzellen beurteilen zu können. Insbesondere zu Beginn der Etablierungsarbeiten konnten einige antikörperabhängige Probleme und Besonderheiten im Färbeverhalten beobachtet werden. Einige dieser Färbearuffälligkeiten konnte man teilweise auf die Diskrepanz zwischen den empfohlenen Herstellerangaben bezüglich angepasster Antikörperverdünnungen und der tatsächlich notwendigen Immunglobulinkonzentration zurückführen. Die meisten initialen Etablierungsfärbeergebnisse zeigten antikörper-spezifisch ein verhältnismäßig zu intensives Färbesbild, sodass die entsprechenden Antikörperverdünnungen erheblich angepasst werden mussten. Es lagen aber auch bei einigen Antikörpern deutlich schwächere Färbeintensitäten vor als in der empfohlenen Verdünnung vom Hersteller beschrieben. Unverändert hingegen blieb der pH-Wert des Demaskierungspuffers, welcher initial bei pH 9 lag. Darüber hinaus wurde die Demaskierungsdauer im Retrieval-Puffer, ausgehend von 20 min, antikörperweise entsprechend adaptiert um die unspezifischen Färbereaktionen im Präparat auf ein akzeptables Minimum zu reduzieren und das spezifische Färbeverhalten gleichzeitig beibehalten zu können. Je kürzer die Demaskierungszeit im Reiskocher gewählt wurde, desto geringer war der Anteil unspezifischer Färberesultate.

Zuletzt wurden die Antikörperkonzentrationen von den Empfehlungen der zugehörigen Herstellerangaben ausgehend optimiert: Die initial verwendeten Verdünnungen betragen für CD80 1:200 bis 1:1000, für B7-H3 1:100 bis 1:1000, für B7-H4 1:25 bis 1:250, für PD-L1 1:100 bis 1:400 sowie für MHC1 1:50 bis 1:500. Am Ende der Etablierung erwiesen sich folgende Verdünnungen als am geeignetsten: CD80 wurde mit 1:3000 gefärbt, B7-H3 mit 1:50, B7-H4 mit 1:600, PD-L1 mit 1:4000 und MHC1 mit 1:50. Bei CD80 und PD-L1 wurde die Demaskierungszeit am stärksten reduziert, während bei B7-H3 und B7-H4 eine Demaskierungsdauer von 17 min am vorteilhaftesten war. Die längste Kochzeit im Reiskocher mit 23 min war für MHC1 notwendig. Die einzelnen Etablierungsreihen mit den jeweiligen Anpassungen sind in Abbildung 9 bis Abbildung 11 exemplarisch dargestellt.

Material und Methoden

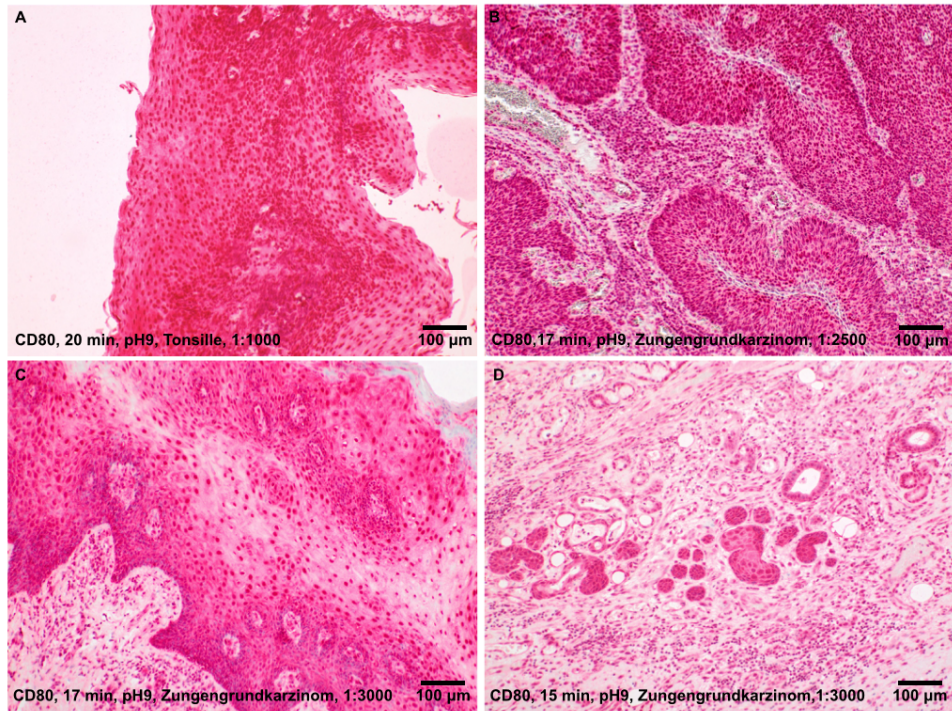


Abb. 9: Etablierung des Antikörpers gegen CD80. Bei 20 min Demaskierungsdauer und einer Verdünnung von 1:1000 zeigte sich in der Tonsille ein deutlich zu intensives und unspezifisches Färbemuster mit Färbewolken (A), sodass als nächstes die Demaskierungszeit auf 17 min und die Antikörperkonzentration stark reduziert wurde (B). Bei 1:3000 (C) erfolgte dann zur Optimierung des Verhältnisses zwischen unspezifischen und spezifischem Färbemuster eine weitere Anpassung der Demaskierungszeit auf 15 min (D)

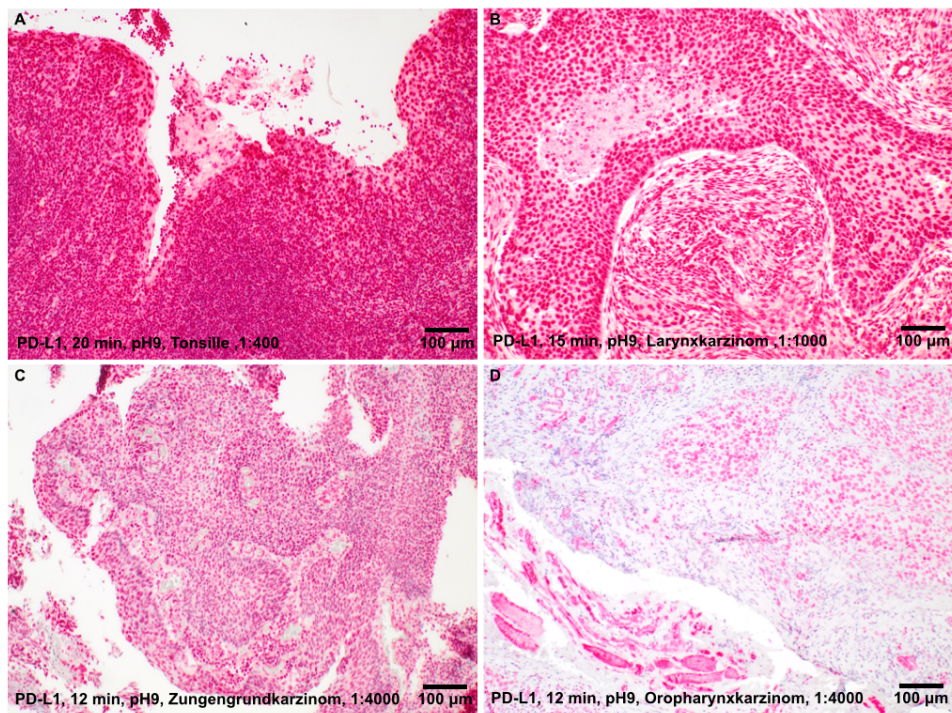


Abb. 10: Etablierung des Antikörpers gegen PD-L1. Bei den immunhistochemischen Färberversuchen mit dem Antikörper gegen PD-L1 wurde die Demaskierungszeit schrittweise reduziert, da das Ausmaß unspezifischer Hintergrundfärbungen initial sehr hoch war (A, B). Der Antikörper musste stark verdünnt werden, da erst unter einer Verdünnung von 1:4000 ein differenziertes tumorspezifisches Färbeverhalten erreicht wurde (C, D)

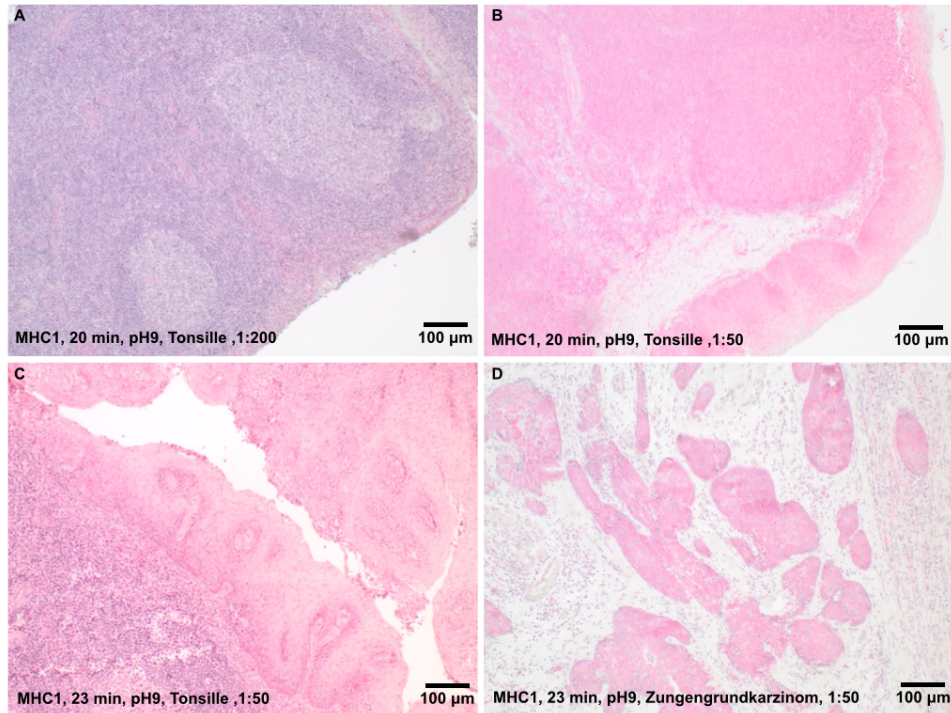


Abb. 11: Etablierung des Antikörpers gegen MHC1. Zu Beginn der Etablierungsarbeiten war bei 20 min Demaskierungsdauer und einer Verdünnung von 1:200 kein differenzierbares Färbemuster ersichtlich (A), sodass im nächsten Schritt eine geringere Antikörperverdünnung gewählt wurde. Dabei zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:50 in der Tonsille ein diffuses zytoplasmatisch betontes Färbemuster mit niedrigem Kontrast (B), sodass als nächstes die Demaskierungszeit auf 23 min erhöht wurde bei gleichbleibender Antikörperkonzentration (C). Dadurch konnten sowohl Leukozyten (C) als auch Tumorzellverbände differenziert und spezifisch visuell dargestellt werden (D).

Nachdem die finalen Protokolle erfolgreich etabliert wurden, schlossen sich entsprechende immunhistochemische Färbungen an dem zu untersuchenden Patientenkollektiv an.

3.2.4 Allgemeiner Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen

<u>Tris-EDTA Retrievalpuffer, pH 9,0:</u>	296,4 ml	H ₂ O _{bidest}
	3,0 ml	1 M Tris-Lösung
	600 µl	0,5 M EDTA-Lösung
<u>0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0:</u>	93,06 g	EDTA
	500 ml	H ₂ O _{bidest}
<u>1 M Tris-Lösung:</u>	12,11 g	Tris-Base
	100 ml	H ₂ O _{bidest}
<u>3% BSA in PBS (pH 7,2):</u>	200 ml	PBS
	6 g	BSA
<u>1% BSA in PBS (pH 7,2):</u>	200 ml	PBS
	2 g	BSA

Zur Fixierung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden diese bei 37 °C über Nacht in den Wärmeschrank gestellt. Für die immunhistochemische Detektion von CD80, MHC1, B7-H3, B7-H4 und PD-L1 erfolgte am nächsten Tag eine Paraffinextraktion der Schnitte durch Einlegen dieser in zunächst zweimal Xylol für jeweils 30 s und anschließend 10 min in Xylol. Danach wurden die Gewebeschnitte für jeweils 30 s nacheinander dreimal in 99%-igem Ethanol, dreimal in 70%-igem Ethanol und zweimal in H₂O_{bidest} gespült. Der angesetzte Tris-EDTA-Retrievalpuffer wurde in der Mikrowelle bei 900W 3 min lang bis auf eine Temperatur von mindestens 95 °C erhitzt und aufgeköcht. Im direkten Anschluss an die Entparaffinisierungsvorgänge erfolgte eine Überführung der Präparate in eine Kunststoffküvette mit aufgeköchtem Tris-EDTA-Retrievalpuffer. Im Zuge der hitze-induzierten Epitop-Demaskierung wurden die Präparate, im Retrievalpuffer befindend, zu antikörperspezifischen Zeiten im Wasserbad des Reiskochers inkubiert. Für den Antikörper gegen CD80 wurde eine Demaskierungszeit im Reiskocher von 15 min, für den Antikörper gegen MHC1 von 23 min, für die Antikörper gegen B7-H4 bzw. B7-H3 von jeweils 17 min und für den Antikörper gegen PD-L1 von 12 min eingehalten. Nach dieser Inkubationsphase im Wasserbad erfolgte eine Abkühlungsphase der Präparate in der mit Retrievalpuffer gefüllten Küvette von 30 min auf mindestens unter 50 °C, woran sich eine Spülungsphase von 3 mal 5 min im Waschpuffer (PBS, pH 7,2) anschloss. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch die nachfolgende Inkubation der Schnitte in 3% BSA in PBS (pH 7,2) für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt gemäß Tab. 3 in 1% BSA/PBS) für 60 min bei Raumtemperatur. Bei jeder Färbeserie wurden sowohl Positivkontrollen als auch Negativkontrollen eingeschlossen. Für die Negativkontrollen wurde anstatt des Primärantikörpers ein Negativkontroll-Reagenz (1% BSA/PBS) verwendet. Die Visualisierung erfolgte im Anschluss mittels Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase und Chromogen Red unter Verwendung des REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED entsprechend den Herstellerangaben. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS (pH 7,2) für jeweils 5 min bei Raumtemperatur für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend wieder einem dreimaligen Waschschrift in PBS (pH 7,2) unterzogen. Nach Inkubation der Schnitte mit Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase bei Raumtemperatur für 30 min und einer darauffolgenden Waschphase für 3 mal 5 min in PBS (pH 7,2), erfolgte schließlich die Inkubation mit der Substrat-Chromogen-Lösung für 13 min. Zu den darauf folgenden Schritten zählten eine 5-minütige Spülung mit H₂O_{bidest}, eine Gegenfärbung mit Sigma Aldrich Hämatoxylin für 7 min und eine 10-minütige fließende Wässerungsphase bevor die Schnitte zum Zweck der Dehydrierung dreimal in 70%-igem Ethanol, dreimal in 99%-igem Ethanol und dreimal in Xylol gespült und anschließend mit Entellan eingedeckt wurden.

3.2.5 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität immunhistologisch gefärbter Präparate erfolgte anhand eines immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele & Stegner 1987). Diese Bewertungsskala berücksichtigt dabei als wesentliche Determinanten sowohl die

antikörperspezifische Färbeintensität als auch die Anzahl positiver Zellen in Relation zur untersuchten Gesamtzellpopulation. Unter diesen Rahmenbedingungen wurde der Tumoranteil der Präparate näher ausgewertet. Weiterhin wurde bei den Antikörpern PD-L1 und CD80 die Immunreaktivität der in den Präparaten vorhandenen Leukozytenpopulationen sowohl peri- als auch intratumoral evaluiert, da sich bei diesen immunologischen Markerproteinen ein lokalisationsabhängiges und heterogenes Färbeverhalten auf leukozytärer Ebene zeigte. Um eine genauere Einordnung der Färbeintensität sowohl antikörper- als auch präparatweise zu gewährleisten wurde in 0,25er Schritten stufenweise von 0 bis 3 eingeteilt: Der Wert 0 spiegelt keine antikörperspezifische Färbereaktion, der Wert 1 eine schwache, der Wert 2 eine mäßige und der Wert 3 eine starke Reaktion wieder. Die Punktzahl repräsentativ für die Anzahl positiver Tumorzellen konnte Werte zwischen 0 bis 4 annehmen, wobei 0 mit keinen positiven Zellen, 1 mit einem Anteil von bis zu 10% an positiven Zellen, 2 mit einem Anteil von 10%-50% an positiven Zellen, 3 mit einem Anteil von 51%-80% an positiven Zellen und 4 mit über 80% positiver Zellen assoziiert wurde. Auf diese Weise ergab sich der entsprechende immunreaktive Score als das Produkt aus Färbeintensität (0-3) und dem Ausmaß positiver Zielzellen (0-4), dessen Werte von 0 bis 12 reichten. Anhand dieser Vorgehensweise wurde die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen am Durchlichtmikroskop durch drei unabhängige Begutachter, davon ein Facharzt für Pathologie, durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Analysen und Methoden der Zellkultivierung

3.3.1 Kultivierung der FaDu-Zelllinie

Die Zervixkarzinomzelllinie HeLa sowie die HNSCC-Zelllinie FaDu wurden zunächst für die funktionellen Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kultur genommen. Dazu wurden die in Kryoröhrchen umgeben von flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in ein Wasserbad bei 37 °C für etwa 30 min zum Auftauen gelegt. Die entsprechenden Zellen lagen dabei als $3 \times 10^6/1,5$ ml Zellsuspensionen vor und wurden mit jeweils 5 ml auf 37°C vorgewärmtem DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt um nach konsekutiver Resuspensionierung bei 1300 rpm 3 min lang abzentrifugiert zu werden. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das jeweilige Zellpellet unter Zusatz von 10 ml DMEM, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 75 cm² Zellwachstumsfläche gegeben. Der weitere Zellkultivierungsprozess erfolgte mit etwa 10 bis 15 ml DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin pro Flasche bei 37°C und einem CO₂-Luftgehalt von 5% (v/v).

In Abhängigkeit vom Ausmaß der Zellwachstumsdichte wurden die Zellen nach entsprechendem Bedarf einem Splittingprozess unterzogen: Dabei wurde zunächst das Medium abgesaugt um anschließend die in der Zellkulturflasche befindlichen adhärennten Zellen mit 5 ml PBS spülen zu können. Nach der Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA um die Zellen von der Wachstumsfläche abzulösen erfolgte eine etwa zehnmünütige Inkubation bei 37°C mit 5% (v/v) CO₂-Begasung im Brutschrank. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 4 ml Medium wurde das 5 ml Zell-Medium-Trypsingemisch mehrmalig resuspendiert und die entsprechende Zellmenge je nach gewünschtem Splittingverhältnis in die Kulturflasche zurückpipettiert und anschließend mit frischem

Medium aufzufüllen, sodass ein Gesamtvolumen von etwa 15 ml erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C mit 5% (v/v) CO₂-Begasung.

Je nach Anforderungen der Experimente zur Etablierung eines geeigneten Zellernteprozederes wurden die Zellen auch durch andere Zelldissoziationsverfahren vom Boden der Zellkulturflasche gelöst: Abb. 12 stellt schematisch den Versuchsablauf der einzelnen Zelldissoziationsprozesse dar. Die hierdurch generierten FaDu-Wildtyp-Zellproben wurden auf das Ausmaß der Proteinexpression von CD80, B7-H3, B7-H4, MHC1 und PD-L1 untersucht, indem diese eine SDS-Gelelektrophorese durchliefen und anschließend ein Western Blot erfolgte.

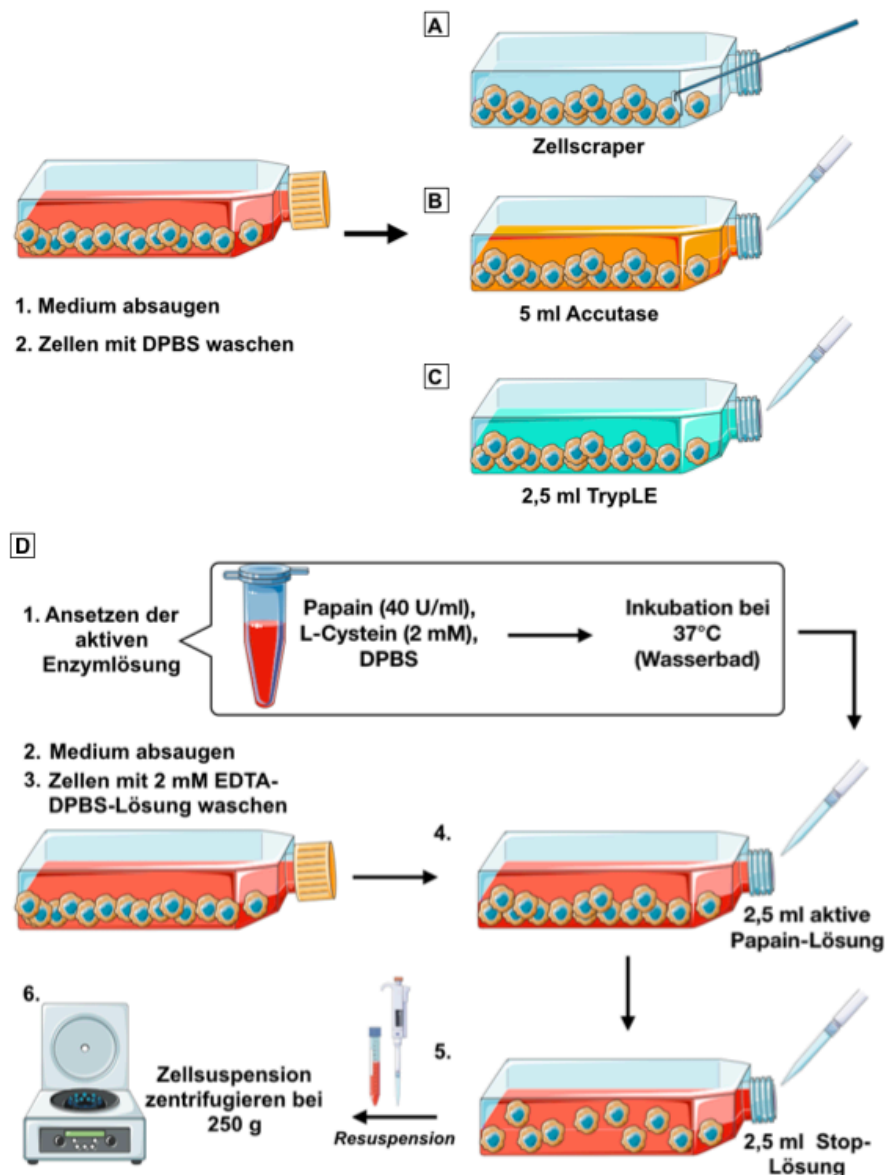


Abb. 12: Verwendete Zelldissoziationsmethoden an FaDu-Wildtyp-Zellen im Rahmen der Etablierungsversuche. Sowohl mechanische (Zellscraper) als auch enzymatische (Accutase®, TrypLe™ Select, Papain) Zellerntemethoden wurden an FaDu-Wildtypzellen angewandt. Um die optimale Methode zur Zelldissoziation der FaDu-Zellen zu bestimmen wurden zunächst eine „enzymfreie“ Vergleichsprobe generiert, indem die adhären Zellen mittels Zellscraper mechanisch unter 5 ml PBS-Einwirkung vom Flaschenboden gelöst wurden. Danach musste die Zellsuspension mehrmals stark resuspendiert werden, um Zellaggregate zu lösen (A). Accutase wurde zu 5 ml auf die Zellen pipettiert und benötigte nach siebenminütiger Inkubation im Brutschrank keine Zugabe einer spezifischen Substanz, um die Enzymreaktion zu stoppen (B). TrypLE wurde

Material und Methoden

zu 2,5 ml auf adhärenente Zellen gegeben. Zum Beenden der TrypLE-vermittelten Zelldissoziationsprozesse erfolgte die Zugabe von 7,5 ml Medium nach etwa fünfminütiger Inkubationsdauer (C). Papain musste vor Gebrauch aktiviert werden, indem durch Zugabe von 2 mM L-Cystein und PBS eine Papain-Lösung mit einer Papainkonzentration von 40 U/ml hergestellt und im Anschluss 10 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt wurde. Nachdem das Zellkulturmedium aus den Flaschen entfernt wurde und die Zellen in 2 mM EDTA-PBS-Lösung zweimal gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 2,5 ml der aktivierten Papain-Lösung. Nach etwa vierminütiger Inkubationsphase bei 37°C im Brutschrank wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml der frisch angesetzten Stop-Lösung (1 mg/ml Trypsin-Inhibitor, 40 µg/mL DNase I, PBS) beendet und die Zellsuspension einige Male resuspendiert um abschließend bei 250 g zentrifugiert zu werden. Zum Schluss wurden die Zellen zur weiteren Verwendung in Medium resuspendiert.

3.4 Analytische Methoden der Proteinbiochemie

3.4.1 Aufbereitung der Zellproben für die Western Blot-Analyse

<u>5x Lämmli-Probenpuffer:</u>	25% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	300 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	10% (w/v)	SDS
	50% (v/v)	Glycerin
<u>1x Lysepuffer:</u>	10 mM	NaCl
	10 mM	Tris, pH 8,0
	3 mM	MgCl
	5% (v/v)	NP-40
		H ₂ O _{bidest}
<u>DNase-Lösung (1mg/ml):</u>	1 mg	DNase
	1 ml	H ₂ O _{bidest}

Die im Western Blot-Verfahren zu untersuchenden Zellpopulationen wurden zunächst mit verschiedenen Dissoziationsverfahren mechanischer und enzymatischer Art vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst (vgl. 3.3.1). Es erfolgte eine automatisierte Zellzählung mittels Luna™ Automated Cell Counter. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau vermengt um von dieser Mischung 10 µl in eine Einwegzählkammer (Luna™ Cell Counting Slides) zu pipettieren. Das Zellzählgerät ermittelte nach Einlesen der Zählkammer die Gesamtzellzahl, die Anzahl der toten bzw. lebenden Zellen sowie die prozentuale Vitalität der untersuchten Zellen. Anschließend wurden 2 x 10⁶ Zellen (gerechnet mit der ermittelten Gesamtzellzahl als Ausgangsmenge) als Zell-Medium-Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben um nachfolgend bei 2200 rpm für 3 min zentrifugiert zu werden. Nach Absaugen bzw. Abpipettieren des Überstandes wurde das entsprechende Zellpellet bei -20°C bis zur Probenaufbereitung gelagert.

Grundvoraussetzung für die Analyse der zellulären Proteine der Zellkulturproben stellt die Auftrennung der entsprechenden Polypeptide aus den lysierten Proteingemischen der Zellen dar. Zur Probenvorbereitung wurden dazu Zellpellets à 2 x 10⁶ Zellen unter Resuspension mit 144 µl Lysepuffer und 16 µl DNase Lösung versetzt. Im Anschluss wurden die aufbereiteten Proben für 30 min bei 37°C und 700 rpm mithilfe eines Labor-Schüttlers inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl 5x Laemmli erfolgte eine erneute Inkubation der Lösung für 10 min bei 56°C in einem Thermomixer. Auf

Raumtemperatur abgekühlte Probenlösungen konnten für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiterverwendet werden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>SDS-Laufpuffer (Elektrodenpuffer):</u>	0,1% (w/v)	SDS
	50 mM	Tris
	384 mM	Glycin
		H ₂ O _{bidest}

Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden einzelne Proteine oder Proteinfragmente in einem elektrischen Gleichspannungsfeld, welches innerhalb eines vertikal orientierten Gels, bestehend aus einem Trenn- und Sammelgel, entsteht, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS), welches eine negative Ladung aufweist, komplexiert Aminosäurereste der Polypeptide und maskiert dadurch die Eigenladung der Polypeptidketten, sodass daraus eine gleichmäßig verteilte negative Nettoladung der Polypeptide in Relation zum Molekulargewicht resultiert. Reduzierende Zusätze, wie β -Mercaptoethanol im Lämmli-Probenpuffer, in Verbindung mit der erhöhten Probenkochtemperatur wirken proteindenaturierend. Grundsätzlich gilt für die Wanderungstrecke von Proteinen im SDS-Gel in einem bestimmten Zeitintervall, dass diese proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der Probe ist. Zur Orientierung im Gel wurde zusätzlich ein Marker (PageRuler™ prestained protein ladder, ThermoFisher) als Probe im Gel aufgetragen. Als Abdichtungsstruktur der Polyacrylamid-Gele diente ein aus 2% (w/v) Agarose gegossenes Bodengel. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 3 h bei 45 mA und wurde beendet sobald die Lauffront kurz oberhalb des Bodengels angelangt war. Im Nachfolgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele und Puffer tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 5: Gießschema für die Gele bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidkonzentration	5 %	12,5 %
Acrylamid (40%)	900 μ l	4,70 ml
Bisacrylamid (2%)	250 μ l	1,25 ml
10% (w/v) SDS	72 μ l	150 μ l
H ₂ O _{bidest}	5 ml	2,85 ml
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8	-	6 ml
1 M Tris/HCl, pH 6,8	900 μ l	-
TEMED	10,5 μ l	5 μ l
20% (v/v) AMPS	67 μ l	45 μ l

3.4.3 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blotting)

<u>Transferpuffer:</u>	12,4 mM	Tris
	96 mM	Glycin
		H ₂ O _{bidest}

Um die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine immunologisch detektieren zu können mussten diese zunächst auf eine aus Polyvinylidendifluorid (PVDF; Porengröße: 0,45 µm) zusammengesetzte Trägermembran übertragen werden („Blotting“). Dies wurde anhand eines Nassblot-Verfahrens vollzogen, bei dem der Elektrotransfer in einem Tank („Trans-Blot Cell“-Apparatur, BioRad, München) in wässrigem Milieu stattfand. Um die hydrophobe PVDF-Membran dem wässrigen Milieu zugänglich zu machen, wurde diese für etwa 30 s in Methanol eingelegt und anschließend einige Male mit destilliertem Wasser abgespült. Zunächst wurden in einer Plastikhalterung ein in Transferpuffer getränkter Schwamm, ein transferpuffergetränktes Whatman-Papier, das SDS-Gel (etwa 110 cm²), die PVDF-Membran, wieder ein transferpuffergetränktes Whatman-Papier sowie ein weiterer in Transferpuffer getränkter Schwamm aufeinander platziert, sodass die Plastikhalterung mit Ausrichtung des Gels zur Kathode bzw. der Trägermembran zur Anode im Blottank fixiert werden konnte. Nach dem Auffüllen des Blottanks mit auf 16°C gekühltem Transferpuffer, wurde der Elektrotransfer durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgel stehenden elektrischen Feldes gestartet. Dieser Prozess fand für 3 h bei 16°C und 400 mA statt.

3.4.4 Immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen

Im Anschluss an den Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst in etwa 15 ml 5% (w/v) Milch-TBS-Lösung für mindestens 30 min eingelegt um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu vermeiden. Nach Abkippen der Milch-TBS-Lösung wurde der in 15 ml 5% (w/v) Milch-TBS-Lösung verdünnte Primäantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran zunächst einmal in TBS für 5min, dann zweimal in TBS-Tween 20 0,05% (v/v) für jeweils 5 min und zuletzt erneut 5 min in TBS gewaschen. Nach Zugabe von 15 ml der Sekundäantikörperlösung in 5% (w/v) Milch-TBS und 60 min lichtgeschützter Inkubation wurde die Membran erneut in TBS bzw. TBS-Tween 20 für jeweils 5 min in der bereits beschriebenen Reihenfolge gewaschen. Die Membran wurde im Anschluss daran mit Whatman-Papier kurz abgetrocknet und lichtgeschützt zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Sollte eine mittels obigem Prozedere bereits vorbehandelte Membran zur erneuten Proteindetektion verwendet werden, so wurde die getrocknete Membran durch 15-30 s Schwenken in Methanol aktiviert um im Anschluss mit der Primäantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert zu werden. Die weiteren Schritte entsprechen dem bereits beschriebenen Vorgehen. Alle verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Als Sekundäantikörper diente der Cy-Fluorophor-gekoppelte Antikörper Anti-Maus-IgG-Cy3. Zur Analyse der Fluoreszenzsignale wurde

der ChemoCam Imager (Intas Science Imaging) genutzt, indem bei 532 nm (Cy3) Detektionswellenlänge die Membran in einem festen Zeitintervall kurz belichtet wurde.

3.5 Statistische Analysen

Die immunhistochemischen Färberesultate wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 7.0 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) statistischen Analysen unterzogen. Die ermittelten Daten wurden mithilfe eines D'Agostino-&-Pearson-normality Tests, eines zweiseitigen Mann-Whitney-U Tests im Falle einer fehlenden Normalverteilung unverbundener Stichproben, sowie eines t-Tests für unverbundene Stichproben bei normalverteilten Zielvariablen generiert. Für die Analyse der Patientenüberlebensdaten wurde ein Mantel-Cox-Test (log-rank-Test) angewandt. Ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wurde festgelegt, sodass p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurden.

3.6 Tumorklassifikation, Staging und Differenzierung

In der Onkologie dient die Stadieneinteilung, das sogenannte "staging", der Feststellung des Ausbreitungsgrades und des Ausmaßes eines bösartigen Tumors, welche als Grundlage für die Therapieentscheidung gilt. Die TNM-Klassifikation stellt ein global etabliertes Klassifikationssystem dar, anhand dessen die Einteilung maligner Tumore schematisch einheitlich erfolgt. Kategorisiert werden dabei die Ausdehnung und das Wachstumsverhalten, repräsentiert durch "T", der Lymphknotenbefall, gekennzeichnet durch "N", sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen, beschrieben durch "M". Anhand weiterer ergänzender Zusatzangaben und Kategorien erfolgt eine detailliertere Charakterisierung des Tumors. Die Verwendung des Präfix "c" weist auf eine klinisch ermittelte Stadieneinteilung hin ("cTNM"), während es sich bei Angabe des Präfix "p" um eine histopathologische Diagnose handelt („pTNM“).

Aufgrund der Rekrutierungszeit der untersuchten Fälle aus den Jahren 2013 bis 2016 in der vorliegenden Arbeit wurde die sechste Version des TNM-Klassifikationssystems aus dem Jahre 2002, genutzt. Dieses kann online eingesehen werden (<https://www.uicc.org/tnm-classification-malignant-tumours-6th-edition>). Zudem existiert eine histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades, das "Grading", von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, die eine Beurteilung der Malignität des Tumors erlaubt. G1 beschreibt einen gut differenzierten Tumor mit wenig Mitosen, G2 ein mäßig differenziertes Malignom und G3 eine schlecht differenzierte sowie mitosenreiche bösartige Neubildung.

3.7 Anonymisiertes Patientenkollektiv

Für die wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden FFPE-Tumorgewebeprobe von 112 Kopf-Hals-Tumor-Patienten mit unterschiedlichen Serum-Vitamin-D-Konzentrationen aufgearbeitet und dann den einzelnen im Ergebnisteil näher beschriebenen immunhistochemischen Analysen unterzogen.

Die überwiegende Mehrzahl der Kopf-Hals-Tumorpatienten besitzen einen stärker verminderten 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel in Relation zur Allgemeinbevölkerung. Dazu kommt, dass das Patientenkollektiv hauptsächlich ältere Menschen mit einbezieht, die ohnehin niedrigere Vitamin-D-Serumspiegel als jüngere Patienten aufweisen. Zudem wird in Deutschland im Gegensatz zu den USA kein Vitamin-D bestimmten Lebensmitteln, wie beispielsweise Milch, zugesetzt (Bittenbring et al. 2014). Daher wurde die 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel-Grenze für das untersuchte Patientenkollektiv bei 10 ng/ml gesetzt. Bei 51 HNSCC-Patienten lag somit eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung (VDA), definiert als 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von mindestens 10 ng/ml, vor. 61 Tumorproben stammten von Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM; 25-OH-Vitamin-D-Spiegel <10 ng/ml).

Die Patienten wurden über den Umstand aufgeklärt und willigten schriftlich ein, dass entnommenes Gewebe, welches für klinisch-histopathologische Untersuchungsmaßnahmen benötigt wurde, für wissenschaftliche Forschungszwecke zur Verfügung gestellt werden durfte. Im Zusammenhang damit lag ein entsprechendes positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes zur Nutzung des Patientenmaterials und der klinischen Daten, Kennziffer 218/10 („Nutzung von humanem Gewebe der Kopf-Hals-Region, welches im Rahmen chirurgischer Eingriffe entfernt werden muss“), bereits im Vorfeld der jeweiligen wissenschaftlichen Untersuchungen vor. Im Folgenden ist das gesamte Kollektiv in anonymisierter Form aufgeführt.

3.7.1 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel

n= 61

Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Diagnose	TNM-Stadium	Vitamin-D [ng/ml]
m	79	Tonsillen-CA	pT1 pN1 cM0 G3	4,00
m	51	Tonsillen-, Zungengrund-CA	cT2 cN2c cM0 G3	8,09
m	49	Zungengrund-CA	cT2 cN2c cM0 G3	8,86
m	69	Tonsillen-CA	pT2 pN2c cM0 G2	7,45
w	53	Tonsillen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	8,29
m	61	Larynx-CA	cT3 cN3 cM0 G2	4,20
m	60	Larynx-CA	cT2 cN2b cM0 G1	9,30
m	58	Zungengrund-Ca	rcT2 pN1 cM0 G2	8,40

Material und Methoden

m	68	Hyopharynx-, Larynx-CA	pT4a pN1 cM0 G2	5,60
m	57	Larynx-CA	cT2 cN2c cM0 G3	5,00
m	53	Hypopharynx-CA	pT2 pN2b cM0 G3	9,90
w	68	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G3	4,80
m	74	Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	6,50
m	78	Larynx-CA	cT3 cN2b cM0 G2	4,00
m	73	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	7,80
m	55	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	5,30
m	59	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	7,80
m	69	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G3	6,70
m	71	Larynx-CA	pT2 pN2b cM0 G2	9,00
m	64	Rezidiv Zungen-CA ED 2006 pT2 pN1 cM0 G3	cT2 cN0 cM0 G1	8,80
m	67	Mundboden-CA	pT1 pN0 cM0 G2	5,80
m	66	Zungen-CA	cT4b cN3 cM0 G2	6,40
m	65	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	4,00
w	78	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cM0 G3	8,10
m	65	Larynx-CA	cT4 pN0 cM0 G2	7,00
m	56	Zungengrund-CA	pT2 pN1 cM0 G2	6,20
m	63	Zungengrund-CA	pT1 pN2b pM1G3	8,00
m	53	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	4,00
m	58	Zungengrund-CA	cT3 pN2b cM0 G3	8,00
m	64	Tonsillen-CA	cT4a cN2c cM0 G3	4,90
m	74	Hypopharynx-CA	cT4a pN0 cM0 G3	5,50
m	66	Zungengrund-CA	cT4b cN3 cM1G3	8,50
m	56	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G3	4,50
w	56	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cMx G3	5,60
m	50	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	5,90
m	59	Zungen-CA	cT3 cN1 cM1 G2	5,30
m	87	Hypopharynx-CA	cT3 cN1 cM0 G3	<4,0
w	66	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	5,80
w	58	Tonsillen-CA	cT4 pN2b cM0 G3	5,40
m	59	Mundboden-CA	pT2 pN3 cM0 G2	5,40
m	80	Larynx-CA	cT4 cN0 cM0 G2	6,60
m	71	Mundboden-CA	cT3 cN2c cM0 G3	5,80
m	65	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G1	9,20

Material und Methoden

m	73	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	8,70
m	57	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	5,80
m	64	Larynx-CA	cT3 pN0 cM0 G2	7,80
m	60	Larynx-Ca	cT3 cN0 cM0 G2	8,2
m	57	Uvula-CA	pT2 pN2c cM0 G2	9,10
m	71	Larynx-CA	pT2 cN2b cM0 G2	5,50
m	55	Zungengrund-CA	pT1 pN2a cM0 G2	5,40
m	48	Zungengrund-CA	pT3 (cT1) pN0 cM0 G2	6,10
m	75	Hypopharynx-CA	cT2 pN0 cM0 G3	8,60
w	68	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	4,20
m	59	Hypopharynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4,80
m	67	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G2	4,80
m	58	Mundboden-CA	cT2 pN0 cM0 G3	5,90
w	64	Zungengrund-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4,00
m	57	Larynx-CA	cT2 pN0 cM0 G2	5,30
m	76	Hypopharynx-CA	cT3 pN2 cM0 G3	6,80
m	60	Hypopharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	4,00
m	70	Zungengrund-CA	cT3 cN2c cM0 G2	4,00

3.7.2 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung

n= 51

Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Diagnose	TNM-Stadium	Vitamin-D [ng/ml]
w	61	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM1 G3	28,70
m	61	Zungengrund-CA	pT1 pN2b cM0 G2	40,80
m	84	Zungen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	18,80
m	74	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G3	18,70
m	58	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cM0 G2	20,80
m	60	Weichgaumen-CA	pT3 pN0 cM0 G2	26,30
m	73	Tonsillen-CA	cT3 pN2b cM0 G3	16,00
w	82	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G2	15,50
m	54	Hypopharynx-CA	cT4 cN0 cM0 G3	38,80
m	72	Zungen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	31,10
m	60	Tonsillen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	29,60
m	65	Zungengrund-CA	pT3 cN0 cM0 G3	18,50
w	80	Wangen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	33,30
w	48	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	29,10
w	34	Zungenrand-CA	pT2 pN1 cM0 G2	18,70
m	50	Zungengrund-CA	cT3 cN0 cM0 G2	16,80
m	66	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	16,20
m	51	Zungengrund-CA	cT2 pN2b cM0 G2	24,00
m	60	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2c cM1 G2	18,10
m	65	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	31,10
w	59	Zungen-CA	pT2 cN0 cM0 G3	38,20
m	65	Larynx-CA	pT4a cN2b cM0 G2	21,80
m	61	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM1 G2	19,80
m	72	Zungengrund-CA	cT2 pN2b cM0 G3	19,70
m	56	Mundboden-CA	cT1 cN0 cM0 G2	25,20
m	53	Mundboden-CA	cT2 pN2c cM0 G2	64,10
m	79	Larynx-CA	pT1b cN0 cM0 G2	22,10
m	80	Tonsillen-CA	pT2 (cT1) pN1 cM0 G3	21,50
w	65	Tonsillen-CA	cT1 pN0 cM0 G3	21,60
m	82	Larynx-CA	cT3 pN1 cM0 G3	16,10
m	71	Zungenrand-CA	cT2 pT1 cM0 G3	15,70

Material und Methoden

m	80	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM0 G3	21,10
w	54	Zungengrund-CA	pT2 pN0 cM0 G2	15,80
w	47	Zungen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	22,80
w	63	Weichgaumen-CA	cT4 pN2c cM0 G2	22,10
w	87	Tonsillen-CA	cT2 cN0 cM0 G2	29,90
m	73	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	16,60
w	58	Tonsillen-CA	cT4 pN2c cM0 G3	16,50
m	66	Tonsillen-CA	cT2 pN1 cM0 G3	19,40
m	66	Zungengrund-CA	cT2 pN0 cM0 G3	13,20
m	64	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G3	13,20
m	63	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G3	10,80
m	57	Larynx-CA	pT3 pN2b cM0 G2	12,60
m	63	Zungengrund-CA	cT3 pN3b cM0 G3	14,40
m	49	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	18,50
w	72	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	35,40
m	70	Zungen-CA	pT1 cN2b cM0 G3	15,30
m	79	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM0 G3	17,50
m	63	Tonsillen-CA	cT2 pN2b cM0 G3	11,20
m	77	Zungengrund-CA	pT2 pN2b cM0 G3	25,10
m	82	Tonsillen-CA	cT4b cN2c cM0 G2	16,70

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Das 112 Kopf-Hals-Tumorpatienten umfassende Kollektiv gliederte sich in 91 männliche und 21 weibliche Patienten. Im Durchschnitt waren die Frauen 63 Jahre alt und die Männer 65 Jahre alt. Bei allen im Kollektiv eingeschlossenen Patienten konnte ein Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert werden, was durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes final bestätigt und klassifiziert wurde. Die analysierten Gewebeproben entstammten überwiegend aus Primärresektaten, wobei im Falle von fehlendem Primärtumorresektaten in wenigen Fällen auf Tumorbiopsien, die im Rahmen einer diagnostischen Planendoskopie entnommen wurden, oder Lymphknotenmetastasen zurückgegriffen wurde. Das Spektrum der Tumorstadien reichte von einem pT1a cN0 cM0- Stadium bis zu einem cT4b cN3 cM1-Stadium. Unter allen Tumorpatienten litten 17 Patienten an einem HPV-positiven Tumor während 95 Patienten HPV-negative Tumoren aufwiesen. Es waren keine Tumorpatienten mit unbekanntem HPV-Status im Kollektiv eingeschlossen. Bei der Ermittlung des HPV-Status gibt es bisher weder eine einheitliche Bestimmungsmethode, noch einen zugelassenen und reliablen Abstrichtest. Zur Ermittlung des HPV-Status der im vorliegenden Kollektiv untersuchten Patienten wurden gleichzeitig der HPV-high-risk-assoziierte Biomarker p16INK4a und der Proliferationsmarker Ki67 unter Zuhilfenahme des CINtec PLUS-Kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) immunhistochemisch nachgewiesen sowie eine PCR zum Nachweis von HPV-DNA angewandt (Linxweiler et al. 2015). Bei positivem Ergebnis der PCR und der dualen p16-Ki67 Immunhistochemie wurde ein Tumor als HPV-positiv gewertet. Zur Bestimmung des Vitamin-D-Serumspiegels wurde den eingeschlossenen Patienten über das ganze Jahr verteilt Blut abgenommen: Sowohl beim VDA- als auch beim VDM-Kollektiv wurde jeweils zu gleichen Anteilen in den Sommer- (April bis September, 52%) und Wintermonaten (Oktober bis März, 48%) Blut abgenommen. Ziel war es, durch diese jahreszeitlich verteilten Blutentnahmen die Auswirkungen einer variablen Sonnenlichtexposition auf die Studienergebnisse möglichst zu vermeiden. In dieser Hinsicht konnte jedoch kein perfekter Abgleich der beiden Teilkollektive erreicht werden, da sich die Patientenrekrutierungszeitpunkte eingeschränkt beeinflussen ließen. Im Vorfeld der Experimente wurde ebenfalls der Ernährungszustand der Tumorpatienten des zu untersuchenden Patientenkollektivs analysiert: Der Vergleich beider Patientengruppen (VDA und VDM) bezüglich des Serumalbumin-Gehalts und des Body-Mass-Index ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kollektiven; das Ausmaß des Alkoholkonsums konnte anhand der vorliegenden Daten nicht adäquat beurteilt werden, da manche Patientenangaben entweder unvollständig oder mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht wahrheitsgemäß gemacht wurden. Weiterhin sind bestimmte Aspekte im Zusammenhang mit den Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, die Einfluss auf den Vitamin-D-Serumspiegel nehmen könnten, nicht in der vorliegenden Arbeit erfasst worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von Hypopharynx-, Larynx-, Tonsillen-, Mundboden-, Zungengrund-, Zungen-, Wangen-, Weichgaumenkarzinomen den immunhistochemischen Analysen

unterzogen (Abb. 13). Dabei war das Larynxkarzinom mit 30 Fällen der häufigste Tumorsubtyp im Kollektiv, gefolgt von dem Tonsillenkarcinom mit 27 Fällen und dem Zungengrundkarzinom mit 21 Fällen. Die HPV-positiven Tumore waren zu zwei Dritteln im Bereich der Tonsille lokalisiert.

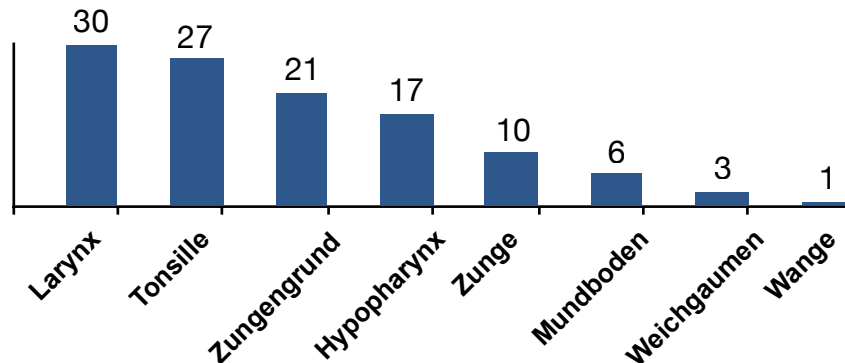


Abb. 13: Statistische Auswertung der Verteilung der Tumorlokalisation in dem untersuchten Patientenkollektiv. Darstellung in Form eines Säulendiagramms. In absteigender Häufigkeitsreihenfolge: Larynx- (n = 30), Tonsillen- (n = 27), Zungengrund- (n = 21), Hypopharynx- (n = 17), Zungen- (n = 10), Mundboden- (n = 6), Weichgaumen- (n = 3) und Wangenkarzinom (n = 1).

4.1.1 Assoziation zwischen Vitamin-D- und HPV-Status

Eine deutlicher Unterschied zwischen den 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegeln ergab sich beim Vergleich der 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von HPV-positiven Tumorpatienten im untersuchten Kollektiv mit denen von HPV-negativen Tumorpatienten: Ein höherer 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel ist mit einem positiven HPV-Status assoziiert. Diese Korrelation war statistisch signifikant ($p = 0,0189$). Der Median lag bei der HPV-positiven Gruppe bei 17,5 ng/ml und bei den HPV-negativen Tumorpatienten bei 8,29 ng/ml während der Mittelwert bei ersteren 16,87 ng/ml (Standardfehler 1,583) und bei letzteren 13,16 ng/ml (Standardfehler 1,073) betrug.

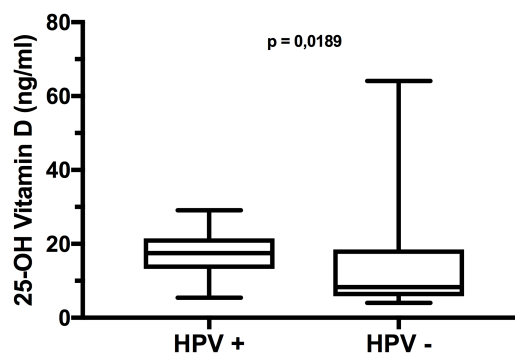


Abb. 14: Statistische Auswertung des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels im Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus. Grafisch dargestellt in Boxplots. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden die 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von HPV-positiven (HPV +) mit HPV-negativen (HPV -) Tumorpatienten miteinander verglichen.

4.2 Charakterisierung der Präparate

4.2.1 Präparatgröße, Leukozytenzahl, Leukozyteninfiltration

Das untersuchte Patientenkollektiv enthält 51 Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM). Um eine potenzielle Verfälschung immunhistochemischer Färberesultate zu vermeiden erfolgte im Vorfeld die Evaluation wichtiger Präparatcharakteristika im Rahmen der Dissertationsarbeit von Herrn Benedikt Balensiefer (Universität des Saarlandes, Homburg), wo das in der vorliegenden Arbeit verwendete Patientenkollektiv (n = 103) erstmals immunhistochemischen Analysen unterzogen wurde. Dabei wurden Eigenschaften wie die Präparatgröße, das Ausmaß der Leukozyteninfiltration und der Tumor- bzw. Stromaanteil verglichen. Die quantitative Analyse der Zellpopulationen und deren Verteilung im Präparat erfolgte im Wesentlichen über eine Punkteskala von 1-4 und die Präparatgröße wurde anhand einer Größeneinteilung von 1-3 ermittelt. Im Gegensatz zum Kollektiv aus der Arbeit von Herrn Balensiefer ist Gegenstand der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ein um 9 Patienten erweitertes Patientenkollektiv, was dieselben Präparateeigenschaften und Gewebeverhältnisse aufweist. Daher werden an dieser Stelle die Auswertungsergebnisse von Benedikt Balensiefer (Universität des Saarlandes, Homburg) zusammengefasst.

Bei der Auswertung der Präparatgröße konnte kein relevanter Unterschied zwischen VDA- und VDM-Patienten festgestellt werden. Dabei entsprach die Flächenausdehnung der Präparate ungefähr 10%-40% der Objektträgerfläche (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg). Hinsichtlich des Tumor- und Stromaanteils der Präparate konnte gezeigt werden, dass zwischen beiden Teilkollektiven, bezogen auf die entsprechende Präparatgröße, die jeweiligen Gewebeanteile sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg). Der Vergleich der Leukozyteninfiltration im VDA- und VDM-Kollektiv lieferte einen hochsignifikanten Unterschied im Sinne einer vermehrten Leukozytenzahl bei den VDA-Patienten (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg). Die Analyse der Leukozytenverteilung auf Tumor- und Stromagewebe diente dazu einzuordnen inwiefern Vitamin-D das lokalisations-spezifische Infiltrationsverhalten von Leukozyten zu beeinflussen vermag und ergab folgende Ergebnisse: Es waren signifikant mehr Leukozyten im Tumor bei VDA-Patienten vorhanden, wobei im Stroma eine höhere Anzahl von Leukozyten bei VDM-Patienten festgestellt wurde (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg). Hierdurch wird ersichtlich, dass keine Korrelation des Vitamin-D-Serumspiegels mit einer vermehrten Leukozyteninfiltration im peritumoralen Stroma besteht, wohingegen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung insgesamt mehr Leukozyten haben.

4.2.2 Auswertung der T- und N-Stadien

Zur Einordnung der Prognose und der Evaluation der am besten geeigneten Therapie von Kopf-Hals-Tumoren ist das Staging entscheidend. Wichtig dabei sind insbesondere das Ausgangsstadium des Tumors zum Operationszeitpunkt und die kontrollierte Verlaufsbeurteilung des TNM-Stadiums um den Therapieerfolg und die Tumorausbreitung genau einschätzen zu können. Hierzu wurden die T- (Tumorausdehnung/Größe) und N- (Lymphknotenbefall) Stadien der jeweiligen Malignome ausgewertet und in Bezug auf den Vitamin-D-Serumspiegel miteinander verglichen (Abb. 15): Es zeigte sich, dass Vitamin-D keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der T- ($p = 0,2917$) und N- ($p = 0,2044$) Stadien hatte, allerdings konnte ein schwacher Trend hin zu höheren T- bzw. N-Stadien unter Vitamin-D-Mangel-Patienten beobachtet werden. Bei den T-Stadien lag der Median für beide Patientengruppen bei 2. Die Mittelwerte bei den T-Stadien lagen im VDM- bzw. VDA-Kollektiv bei 2,389 bzw. 2,594 und der Standardfehler betrug bei den VDM-Patienten 0,1254 bzw. 0,1279 bei den VDA-Patienten. Bei den N-Stadien betrug der Median bei den VDM-Patienten 2 und im VDA-Kollektiv 1. Die entsprechenden Mittelwerte lagen im VDM-Kollektiv bei 1,375 und im VDA-Kollektiv bei 1,148. In der VDM-Gruppe betrug der Standardfehler 0,127 und bei den VDA-Patienten 0,1279.

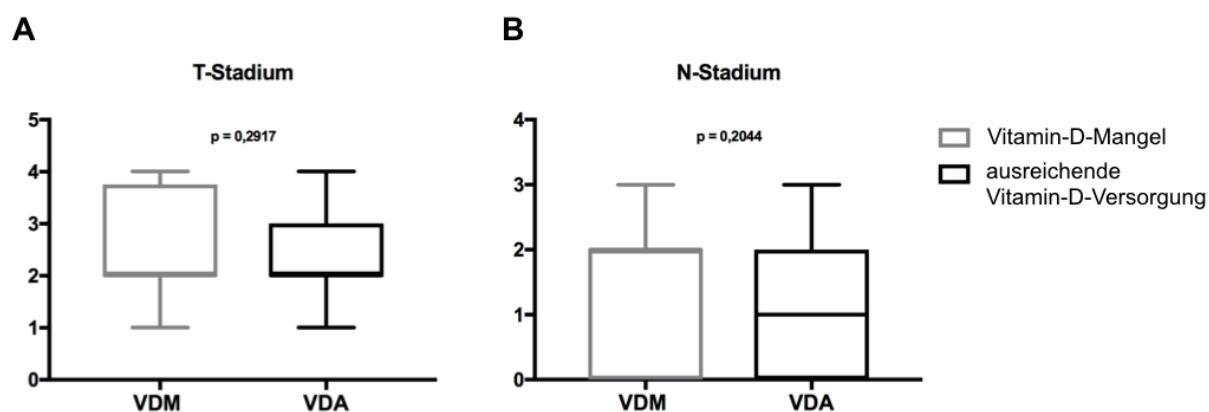


Abb. 15: Statistische Auswertung des T-Stadiums (A) und des N-Stadiums (B) der eingeschlossenen Patienten. In Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status wurden die T- und N-Stadien ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen

Präparate von 112 verschiedenen Tumorpatienten wurden anhand im Vorfeld etablierter Standardprotokolle immunhistochemisch mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um zu ermitteln, ob die Höhe des Vitamin-D-Serumspiegels oder der HPV-Status einen Einfluss auf die Expression von fünf unterschiedlichen Immunrezeptoren im Tumorgewebe haben: Untersucht wurden CD80, B7-H3 und MHC1 als immunstimulierende Moleküle der Anti-Tumor-Immunantwort sowie PD-L1 und B7-H4 als immuninhibierende Marker. Außerdem wurde die PD-L1 und CD80-Expression zusätzlich auf intra- und peritumoralen Leukozyteninfiltraten analysiert.

4.3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD80 an HNSCCs

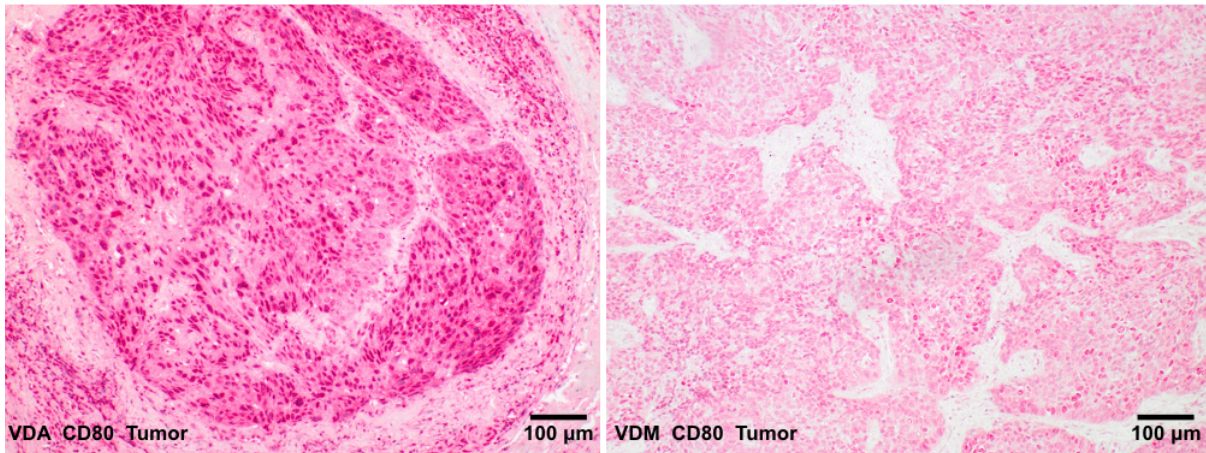


Abb. 16: CD80-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Das tumorspezifische Färbeverhalten ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt.

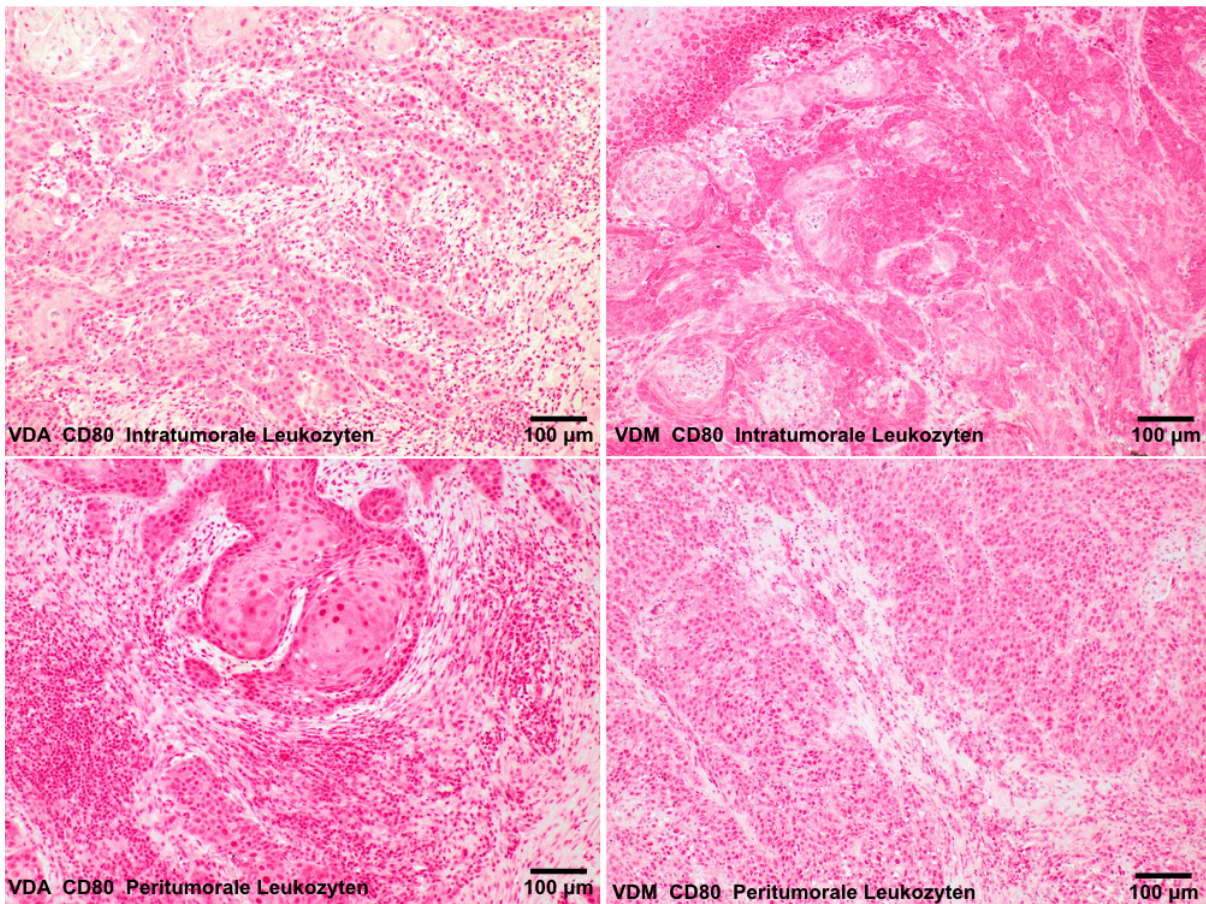


Abb. 17: CD80-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Repräsentativ dargestellt ist der Vergleich der intratumoralen und peritumoralen Leukozyteninfiltration im Tumorgewebe, jeweils für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der rechten Abbildungshälfte und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der linken Bildhälfte.

Ergebnisse

Das typische Färbeverhalten CD80-positiver Tumorzellen ist exemplarisch jeweils für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in Abbildung 16 dargestellt. Weiterhin ist die immunhistochemische Färbung CD80-positiver Leukozyten sowohl peris als auch intratumoraler Lokalisation in Abbildung 17 gezeigt. Die antikörperspezifische Färbung der Zellen ist gekennzeichnet durch ein intensiv rotes und nukleär betontes Färbepild, wobei auch zytoplasmatische Anteile, insbesondere bei den Tumorzellen, stark erfasst werden. Bei Betrachtung der Tumormorphologie zeigt sich ein invasives Wachstumsmuster mit strangförmig angeordneten Zellverbänden sowie lokalisierten Tumorzellinseln. Die Leukozyten sind nukleär betont dunkel rot angefärbt. Die statistische Auswertung der tumoralen und leukozytären CD80-Expression ist in Abbildung 18 gezeigt. Bei VDA-Patienten besteht eine starke Tendenz zu einer vermehrten CD80-Tumorexpression im Vergleich zu VDM-Patienten ($p = 0,0707$). Der Mittelwert lag im VDM-Kollektiv bei 8,5 (Standardfehler 0,381) und im VDA-Kollektiv bei 9,434 (Standardfehler 0,398). Ebenso exprimieren die peritumorale Leukozyten bei VDA-Patienten signifikant mehr CD80 ($p = 0,0324$), während dieser Trend bei den intratumoralen Leukozyten nicht so deutlich zu beobachten war ($p = 0,3533$). Der Median lag bei der intratumoral-leukozytären CD80-Expression im VDM-Kollektiv bei 7,5 und im VDA-Kollektiv bei 9 während bei der peritumoral-leukozytären CD80-Expression der Median bei den VDM- bzw. VDA-Patienten bei 7 bzw. 8,75 betrug.

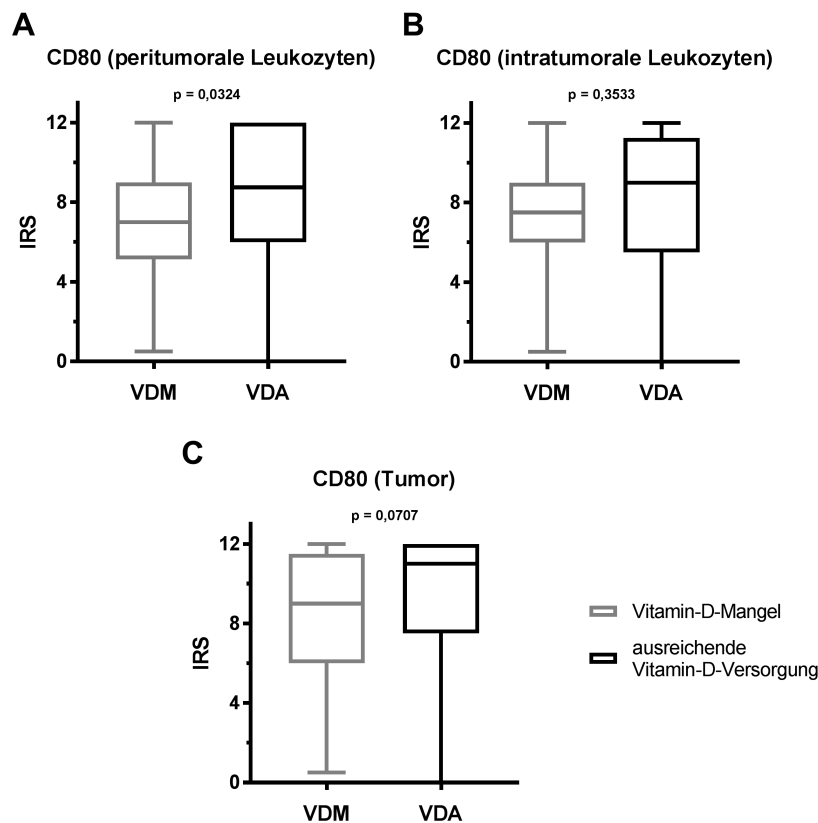


Abb. 18: Statistische Auswertung der CD80-Expression auf auf peri (A)- und intratumoralen (B) Leukozyten sowie Tumorzellen (C) in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde eine Analyse der tumoralen und leukozytären CD80-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten des untersuchten Kollektivs durchgeführt: Der Vergleich zeigte, wie in Abbildung 19 ersichtlich, keine Korrelation zwischen dem HPV-Status und den IRS-Werten. Der p-Wert für die tumorale CD80-Expression lag bei 0,8109. Die entsprechenden p-Werte für die peri- und intratumoral-leukozytäre CD80-Expression betragen 0,8431 und 0,8038.

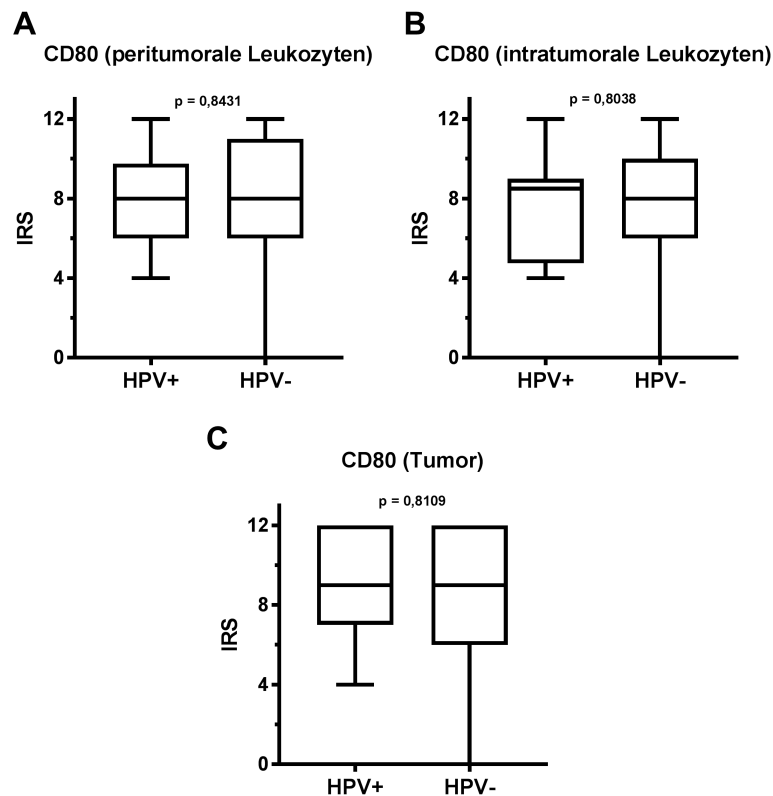


Abb. 19: Statistische Auswertung der CD80-Expression auf auf peri (A)- und intratumoralen (B) Leukozyten sowie Tumorzellen (C) in Abhängigkeit vom HPV-Status. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem positiven HPV-Status (HPV+) mit Patienten mit einem negativen HPV-Status (HPV-) miteinander verglichen.

4.3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von B7-H3 (CD276) an HNSCCs

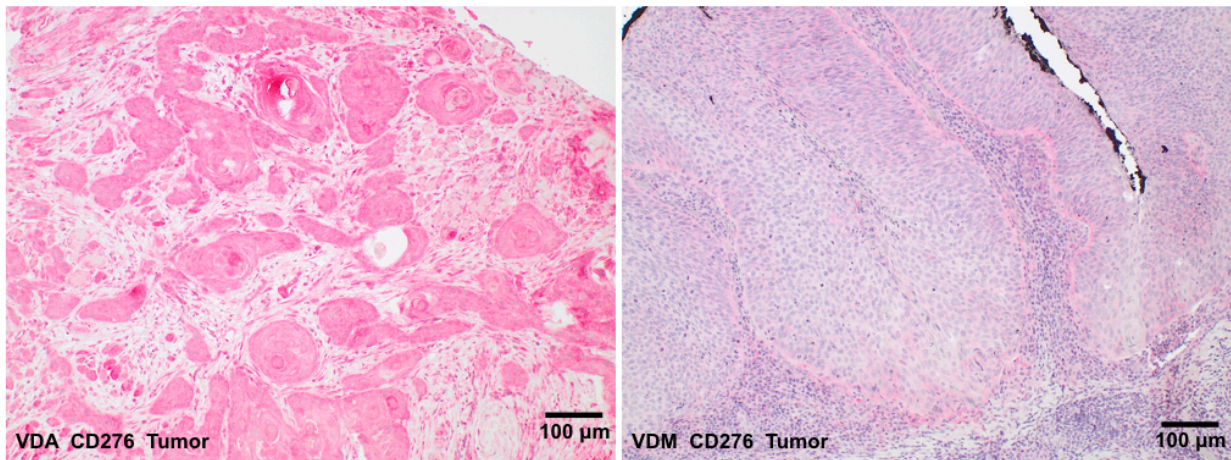


Abb. 20: B7-H3 (CD276)-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Das tumorspezifische Färbeverhalten ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt.

Das typische Färbeverhalten B7-H3-positiver Tumorzellen ist exemplarisch jeweils für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in Abbildung 20 dargestellt. Die antikörperspezifische Färbung der Zellen stellt sich durch ein überwiegend zytoplasmatisch betontes Färbepild dar. Die statistische Auswertung der tumoralen B7-H3-Expression ist in Abbildung 21 gezeigt: Es konnte eine signifikant erhöhte B7-H3-Expression auf Tumorgewebe bei Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung im Vergleich zu Tumorkranken mit Vitamin-D-Mangel nachgewiesen werden ($p = 0,0052$). Der Mittelwert lag bei den VDM-Patienten bei 5,694 (Standardfehler 0,415) und bei den VDA-Patienten bei 7,491 (Standardfehler 0,486).

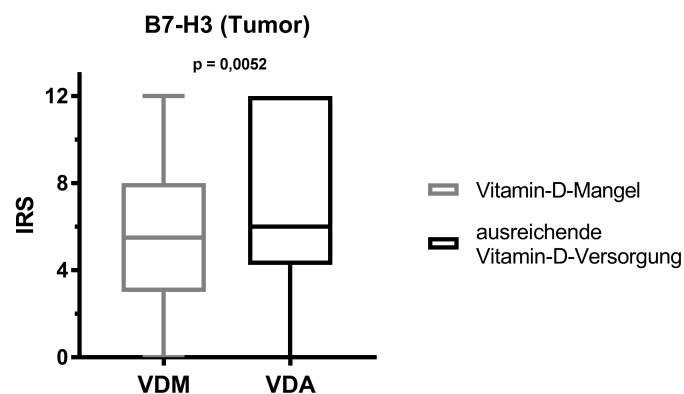


Abb. 21: Statistische Auswertung der B7-H3-Expression auf Tumorzellen in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde eine Analyse der tumoralen B7-H3-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten des untersuchten Kollektivs durchgeführt: Der Vergleich zeigte, wie in Abbildung 22 ersichtlich, eine deutliche Korrelation zwischen dem HPV-Status und den IRS-Werten. Patienten mit einem positiven HPV-Status exprimierten signifikant weniger B7-H3 auf dem Tumor als HPV-negative Tumorpatienten ($p = 0,0262$). Der Mittelwert lag bei den HPV-positiven bzw. HPV-negativen Tumorpatienten bei 4,794 (Standardfehler 0,5492) bzw. 6,847 (Standardfehler 0,3665), der Median bei 4 (HPV+) bzw. 6 (HPV-).

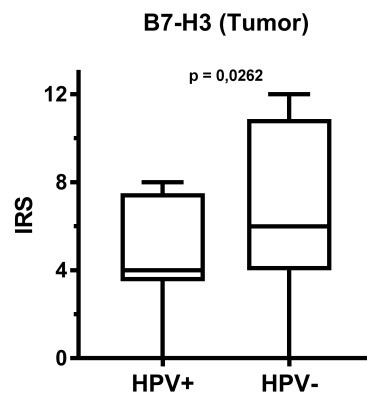


Abb. 22: Statistische Auswertung der B7-H3-Tumorexpression im Zusammenhang mit dem HPV-Status der Tumorpatienten. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem positiven HPV-Status (HPV+) mit Patienten mit einem negativen HPV-Status (HPV-) miteinander verglichen.

4.3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von B7-H4 an HNSCCs

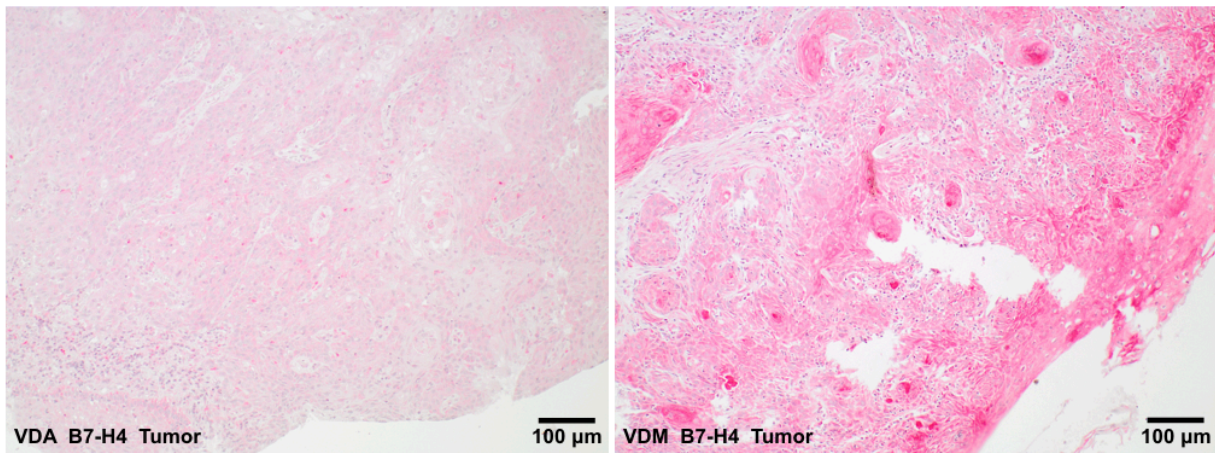


Abb. 23: B7-H4-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Das tumorspezifische Färbeverhalten ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt.

Das typische Färbeverhalten B7-H4-positiver Tumorzellen ist exemplarisch jeweils für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in Abbildung 23 dargestellt. Die antikörperspezifische Färbung der Zellen stellt sich durch ein überwiegend zytoplasmatisch betontes Färbepild dar, wobei auch vereinzelt nukleäre Anteile der Tumorzellen angefärbt werden. Die statistische Auswertung der tumoralen B7-H4-Expression ist in Abbildung 24 gezeigt. Die Ergebnisse der B7-H4-Immunhistochemie verdeutlichen die Tendenz zu einer erniedrigten B7-H4-Expression auf Tumorgewebe bei gutem Vitamin-D-Status im Vergleich zu Tumorpatienten mit Vitamin-D-Mangel, die im Schnitt höhere IRS-Werte zeigten ($p = 0,0705$). Der Mittelwert lag im VDM-Kollektiv bei 7,089 (Standardfehler 0,435) und im VDA-Kollektiv bei 5,942 (Standardfehler 0,448). Der Median betrug im VDM-Kollektiv 7,5 und im VDA-Kollektiv 4,25.

Ergebnisse

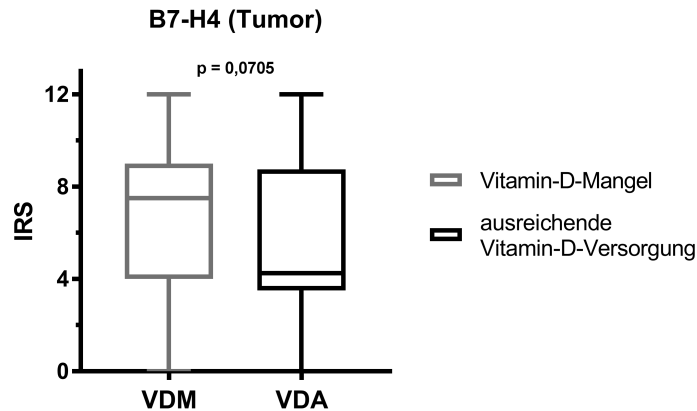


Abb. 24: Statistische Auswertung der B7-H4-Expression auf Tumorzellen in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

Zusätzlich wurde eine Analyse der tumoralen B7-H4-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten des untersuchten Kollektivs durchgeführt: Der Vergleich zeigte, wie in Abbildung 25 ersichtlich, eine Tendenz zu einer gesteigerten tumoralen B7-H4-Expression bei negativem HPV-Status ($p = 0,1332$). Der Mittelwert lag bei den HPV-positiven bzw. HPV-negativen Tumorpatienten bei 5,563 (Standardfehler 0,8538) bzw. 6,73 (Standardfehler 0,3389), der Median bei 4 (HPV+) bzw. 7,5 (HPV-).

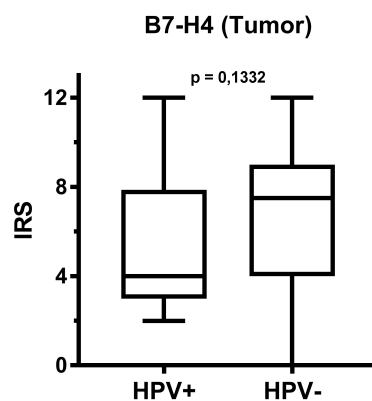


Abb. 25: Statistische Auswertung der B7-H4-Tumorexpression im Zusammenhang mit dem HPV-Status der Tumorpatienten. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem positiven HPV-Status (HPV+) mit Patienten mit einem negativen HPV-Status (HPV-) miteinander verglichen.

4.3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PD-L1 an HNSCCs

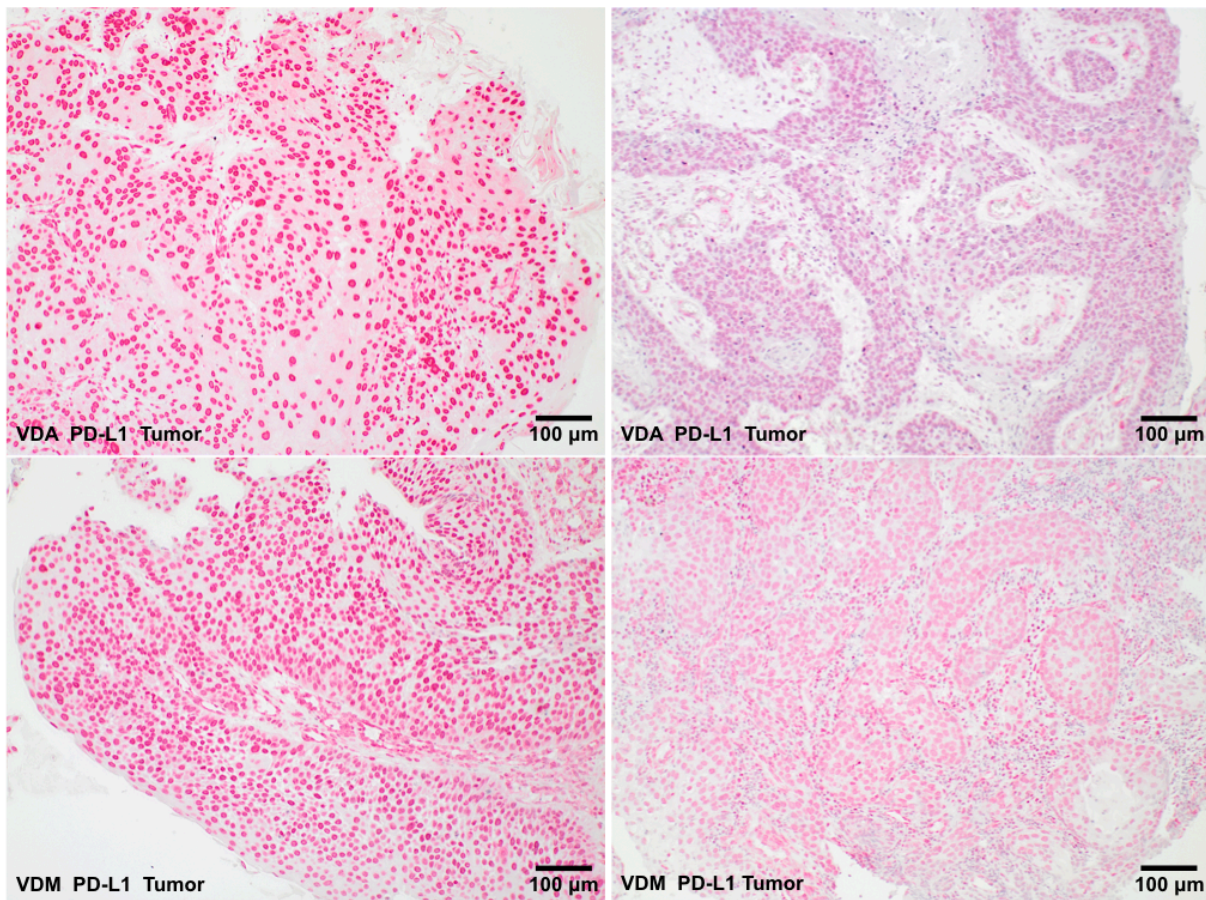


Abb. 26: PD-L1-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Das tumorspezifische Färbeverhalten ist repräsentativ für Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt. In der oberen Abbildungshälfte ist links ein Beispiel für ein intensives tumorbetontes Färbepild und rechts ein schwächeres tumorspezifisches Färbepild bei VDA-Patienten gezeigt. Die untere Bildhälfte bildet entsprechende Beispiele für VDM-Patienten ab.

Das typische Färbeverhalten PD-L1-positiver Tumorzellen ist exemplarisch jeweils für zwei Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in Abbildung 26 dargestellt. Weiterhin ist die immunhistochemische Färbung PD-L1-positiver Leukozyten sowohl peritumoral als auch intratumoral beispielhaft für VDM- und VDA-Patienten in Abbildung 28 gezeigt. Die antikörperspezifische Färbung der Zellen ist gekennzeichnet durch ein intensiv rotes und nukleär betontes Färbepild. Die Leukozyten sind nukleär betont dunkel rot angefärbt. Die statistische Auswertung der tumoralen sowie leukozytären PD-L1-Expression ist in Abbildung 27 gezeigt. Die Ergebnisse konnten keinen kausalen Zusammenhang zwischen dem Vitamin-D-Status und der PD-L1-Tumorexpression aufzeigen ($p = 0,4730$). Sowohl bei VDM-Patienten als auch bei VDA-Patienten waren hohe und niedrige IRS-Werte gleichmäßig vertreten, wie auch den repräsentativen Präparatfärbungen für diese Fälle aus Abbildung 26 zu entnehmen ist. Der Mittelwert lag im VDM-

Ergebnisse

Kollektiv bei 7,775 (Standardfehler 0,439) und im VDA-Kollektiv bei 8,24 (Standardfehler 0,457). Der Median betrug in beiden Teilkollektiven 8. Zudem konnte kein direkter Einfluss des Vitamin-D-Serumspiegels auf das peritumoral-leukozytäre ($p = 0,4032$) und intratumoral-leukozytäre ($p = 0,8210$) Expressionsverhalten von PD-L1 beobachtet werden. Für die peritumoral-leukozytäre PD-L1-Expression lag der Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 5,393 (Standardfehler 0,353) und im VDA-Kollektiv bei 5,01 (Standardfehler 0,469). Für die intratumoral-leukozytäre PD-L1-Expression lag der Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 5,41 (Standardfehler 0,380) und im VDA-Kollektiv bei 5,549 (Standardfehler 0,493). Der Median betrug in beiden Teilkollektiven für sowohl die peritumoral- als auch die intratumoral-leukozytäre PD-L1-Expression 4.

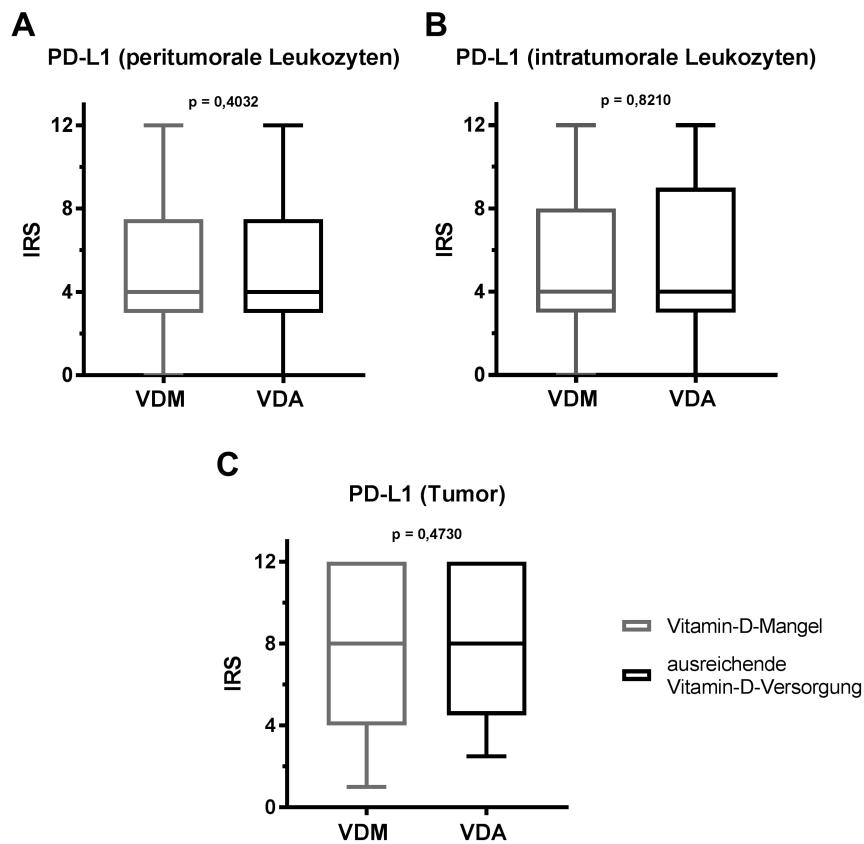


Abb. 27: Statistische Auswertung der PD-L1-Expression auf auf peri (A)- und intratumoralen (B) Leukozyten sowie Tumorzellen (C) in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

Ergebnisse

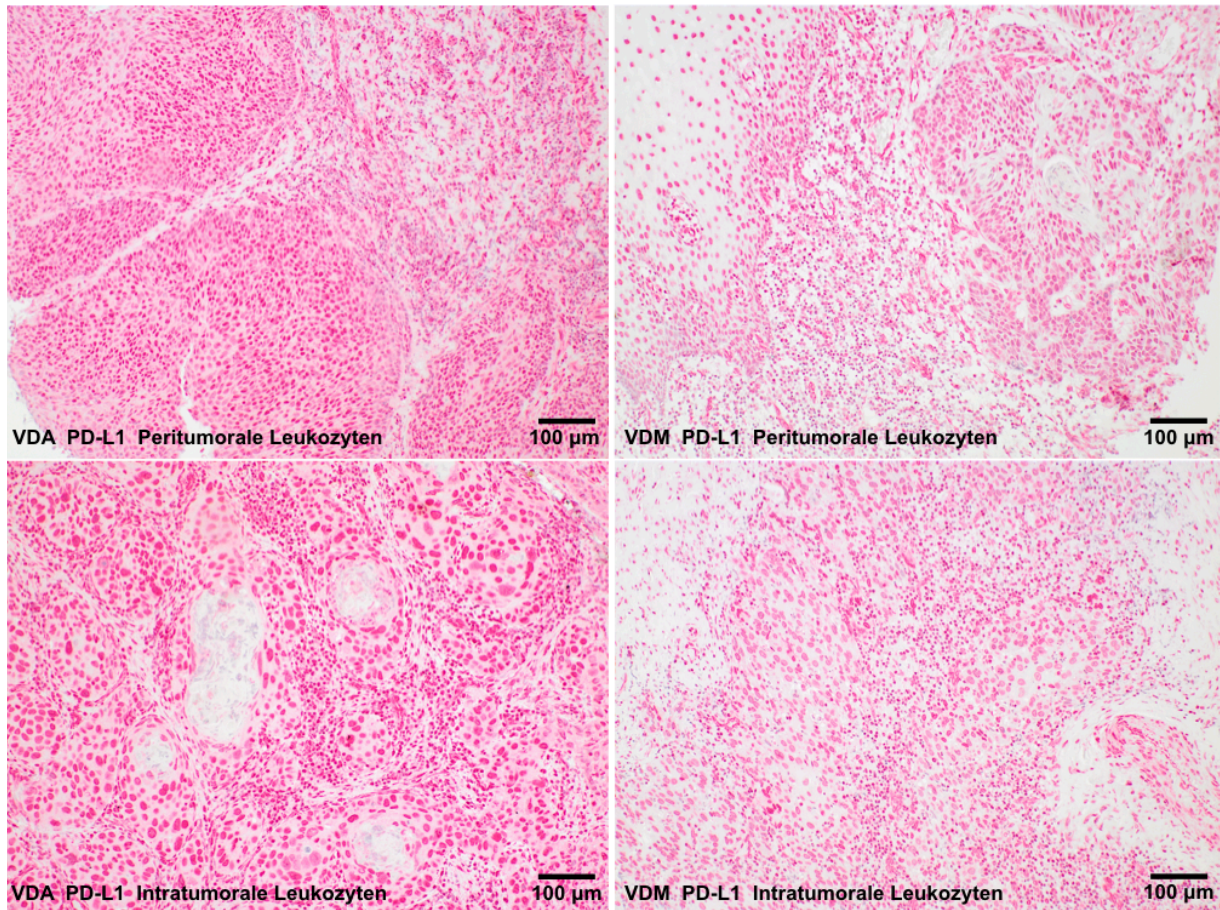


Abb. 28: PD-L1-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Repräsentativ dargestellt ist der Vergleich der intratumoralen und peritumoralen Leukozyteninfiltration im Tumorgewebe, jeweils zwischen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der rechten Abbildungshälfte und solchen mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der linken Bildhälfte. In der oberen Bildhälfte sind Färbebeispiele für die peritumorale Leukozyten, in der unteren Bildhälfte für die intratumoralen Leukozyten gezeigt.

Zudem wurde eine Analyse der IRS-Werte für die PD-L1-Tumorexpression und die peri- und intratumoral-leukozytäre PD-L1-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten des untersuchten Kollektivs durchgeführt: Der Vergleich zeigte, wie in Abbildung 29 ersichtlich, eine klare Tendenz zu höheren PD-L1-Tumor-IRS-Werten bei HPV-positiven Tumorpatienten ($p = 0,0784$). Der Median lag bei den HPV-positiven bzw. HPV-negativen Tumorpatienten bei 10,5 bzw. 8. Bei Betrachtung des statistischen Vergleichs der peri- bzw. intratumoral-leukozytären PD-L1-Expression zeigt sich keine Abhängigkeit der IRS-Werte vom HPV-Status ($p = 0,8634$ bzw. $p = 0,4491$).

Ergebnisse

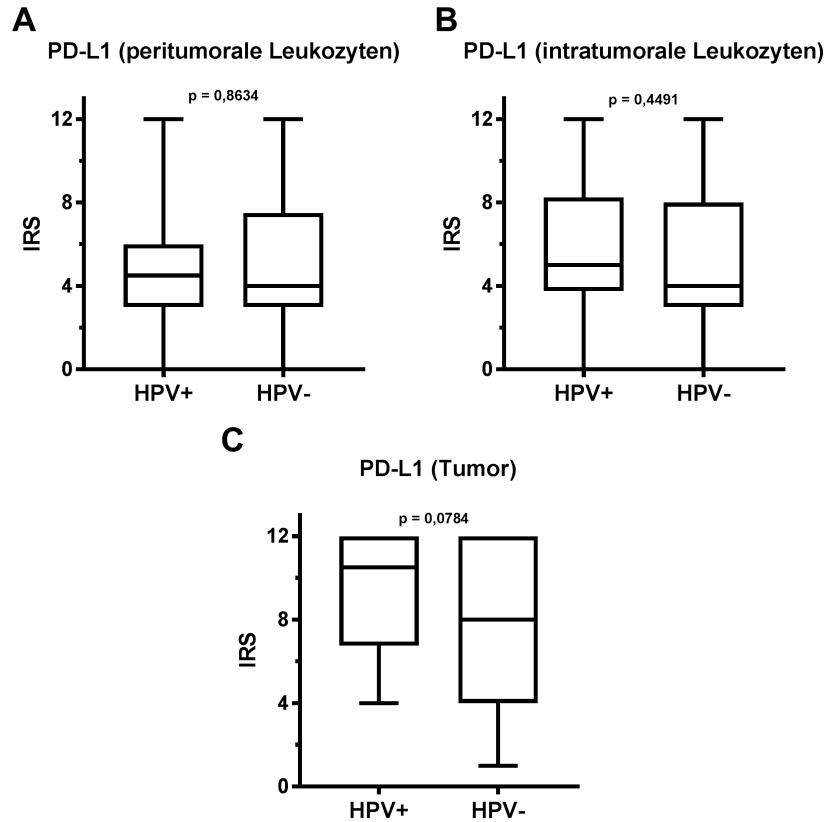


Abb. 29: Statistische PD-L1-Expression auf auf peri (A)- und intratumoralen (B) Leukozyten sowie Tumorzellen (C) in Abhängigkeit vom HPV-Status. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Linie innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem positiven HPV-Status (HPV+) mit Patienten mit einem negativen HPV-Status (HPV-) miteinander verglichen.

4.3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von MHC1 an HNSCCs

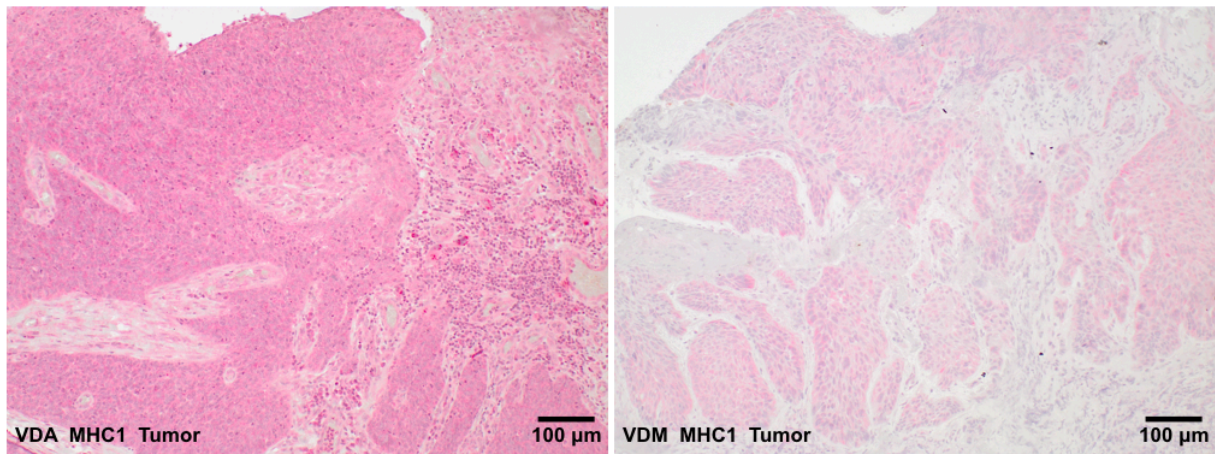


Abb. 30: MHC1-Immunhistochemie an HNSCC-Tumorproben. Das tumorspezifische Färbeverhalten ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt.

Das typische Färbeverhalten MHC1-positiver Tumorzellen ist exemplarisch jeweils für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) und mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in Abbildung 30 dargestellt. Die antikörperspezifische Färbung der Zellen stellt sich durch ein überwiegend zytoplasmatisch betontes Färbepild dar. Die statistische Auswertung der tumoralen MHC1-Expression ist in Abbildung 31 gezeigt. Die Ergebnisse der MHC1-Immunhistochemie zeigen eine signifikant höhere MHC1-Expression auf Tumorgewebe bei VDA-Patienten im Vergleich zu Tumorpatienten mit einem Vitamin-D-Mangel ($p = 0,0190$). Der Mittelwert lag im VDM-Kollektiv bei 3,439 (Standardfehler 0,323) und im VDA-Kollektiv bei 4,534 (Standardfehler 0,322). Der Median betrug in beiden Teilkollektiven 8.

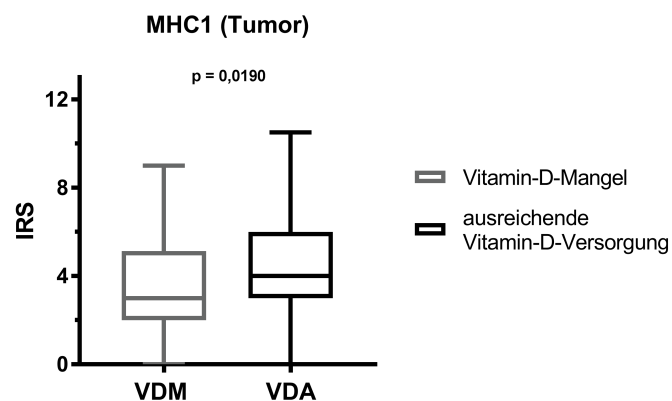


Abb. 31: Statistische Auswertung der MHC1-Expression auf Tumorzellen in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) miteinander verglichen.

Zusätzlich wurde eine Analyse der tumoralen MHC1-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten des untersuchten Kollektivs durchgeführt: Der Vergleich zeigte, wie in Abbildung 32 ersichtlich, eine deutliche Korrelation zwischen dem HPV-Status und den IRS-Werten. Patienten mit einem positiven HPV-Status exprimierten tumoral signifikant mehr MHC1 als HPV-negative Tumorpatienten ($p = 0,0053$). Der Mittelwert lag bei den HPV-positiven bzw. HPV-negativen Tumorpatienten bei 5,485 (Standardfehler 0,559) bzw. 3,661 (Standardfehler 0,247), der Median bei 5,25 (HPV+) bzw. 3,5 (HPV-).

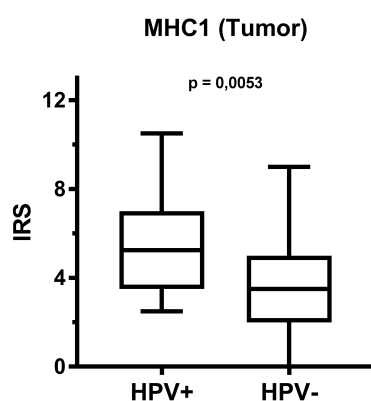


Abb. 32: Statistische Auswertung der MHC1-Tumorexpression im Zusammenhang mit dem HPV-Status der Tumorpatienten. Anhand eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde das Ausmaß der antikörperspezifischen Färbung ausgewertet und in Boxplots grafisch dargestellt. Der Interquartilsabstand wird durch die Box, der Median als durchgezogene Line innerhalb der Box, repräsentiert. Die Whisker repräsentieren den Abstand vom Minimum zum Maximum. Es wurden jeweils Patienten mit einem positiven HPV-Status (HPV+) mit Patienten mit einem negativen HPV-Status (HPV-) miteinander verglichen.

4.4 Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die immunhistochemischen Analysen der untersuchten stimulierenden Immunrezeptoren (CD80, B7-H3 und MHC1) deuten auf eine klare Tendenz zur gesteigerten tumoralen Expression bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung hin. Insbesondere bei MHC1 und bei B7-H3 war dieser Effekt signifikant zu beobachten. Bei der Evaluation der tumoralen Expression der immuninhibitorischen Marker konnte nur bei B7-H4 ein möglicher Zusammenhang eruiert werden: Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel tendierten zu einer stärkeren Expression von B7-H4 auf Tumorzellen. Im Bezug auf die tumorale Expression von PD-L1 konnte kein bedeutsamer Unterschied zwischen den beiden Kollektiven festgestellt werden. Weiterhin wurde im Falle von CD80 und PD-L1 das leukozytäre Expressionsverhalten unter Vitamin-D-Einfluss untersucht: Hier konnte sowohl peri- als auch intra-tumoral bei PD-L1 kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Im Falle von CD80 zeigte sich lediglich bei Betrachtung der peritumoralen Leukozyten ein signifikantes Ergebnis, welches durch die vermehrte CD80-Expression bei Patienten des VDA-Kollektivs gekennzeichnet war. Somit lies sich die Tendenz zur stärkeren CD80 Expression bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung sowohl auf Tumor- als auch auf Immunzellebene beobachten.

4.5 Überlebensanalyse

4.5.1 Überlebensanalyse abhängig vom HPV- und Vitamin-D-Status

Bei Betrachtung der nach dem Kaplan-Meier-Verfahren erstellten Überlebenskurven des Patientenkollektivs in Abbildung 33A wird ersichtlich, dass Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben aufweisen ($p = 0,0288$). Im Schnitt lebten diese Patienten mit einem medianen Überleben von 31 Monaten 10 Monate länger als solche mit einem Vitamin-D-Mangel, bei denen das mediane Überleben bei 21 Monaten lag. Ein signifikanten Überlebensvorteil konnte ebenso bei Patienten mit HPV-positivem (HPV+) Tumorstatus im Vergleich zu solchen mit HPV-negativem (HPV-) Tumorstatus nachgewiesen werden ($p = 0,0253$, Abb. 33B). Bei HPV-negativen Tumorpatienten resultierte eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung ebenfalls in einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit Vitamin-D-Mangel ($p = 0,0325$, Abb. 33C), bei HPV-positiven Patienten war dieser Trend jedoch nicht zu beobachten ($p = 0,4060$, Abb. 33D).

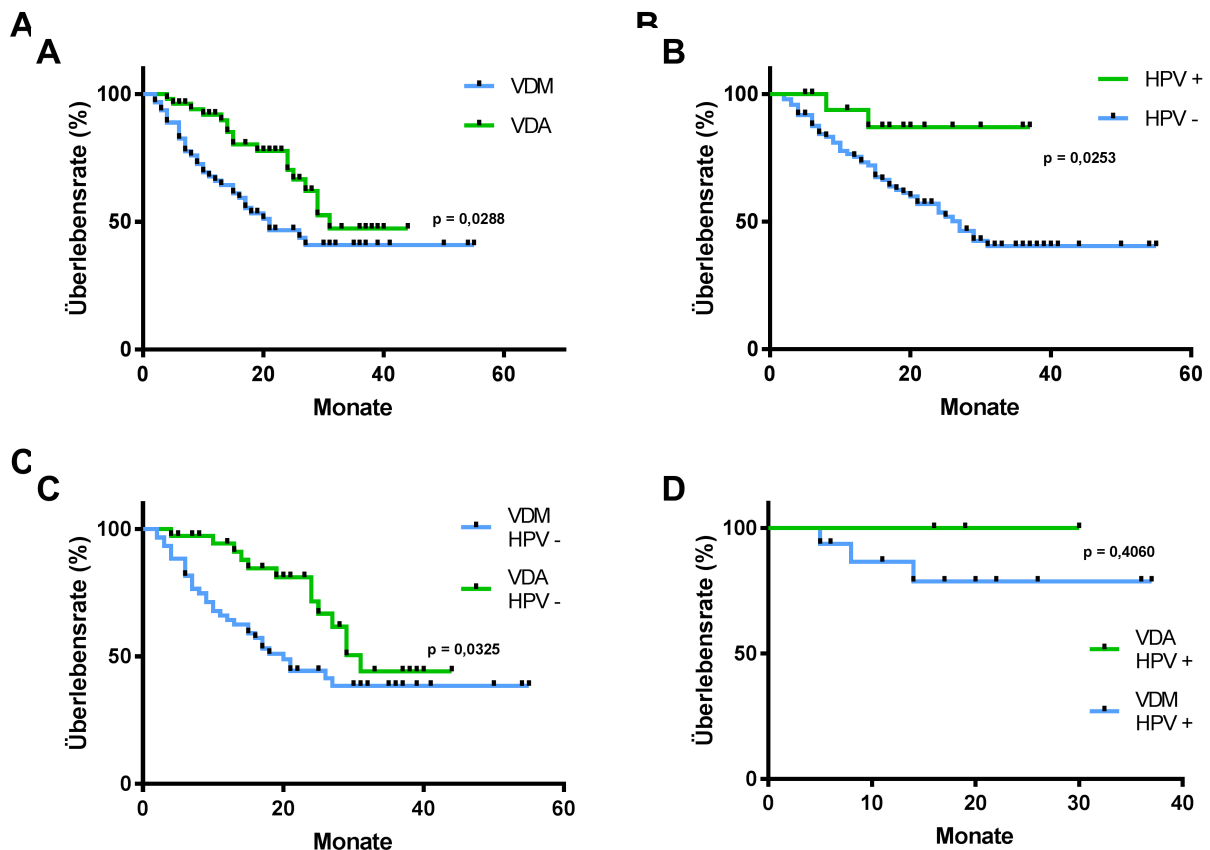


Abb. 33: Einfluss des Vitamin-D- und HPV-Status auf das Gesamtüberleben bei HNSCC-Patienten. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom Vitamin-D- (A), und vom HPV-Status (B). Des weiteren wurde unter HPV-negativen (C) und HPV-positiven (D) Tumorpatienten das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status verglichen. Zensierte Daten wurden durch schwarze Punkte symbolisiert. VDA (ausreichende Vitamin-D-Versorgung); VDM (Vitamin-D-Mangel); HPV + (HPV-positiv); HPV - (HPV-negativ).

4.5.2 Überlebensanalysen des Patientenkollektivs abhängig vom Vitamin-D-Status sowie immunhistochemischer Parameter

Zur Bestimmung der Patientengruppen mit hoher bzw. niedriger Immunrezeptorexpression wurde jeweils für jeden analysierten Marker (CD80, MHC1, B7-H4, B7-H3 und PD-L1) der auf-/bzw. abgerundete Mittelwert aller ermittelten Immunreaktiven Scores (IRS) bestimmt und anschließend eingeteilt in Patienten mit IRS-Werten unterhalb des Mittelwertes („low“-Kollektiv) und solchen mit IRS-Werten, die mindestens dem Mittelwert entsprachen („high“-Kollektiv), eingeteilt. Für die CD80-Tumorexpression betrug der IRS-Mittelwert 9,0, für die CD80-Expression auf peritumoralen und intratumoralen Leukozyten jeweils 8,0. Der PD-L1-IRS-Mittelwert für die Tumorexpression war 8,0, für die intratumoralen Leukozyten 5,5 sowie für die peritumoralen Leukozyten 5,0. Die IRS-Mittelwerte für die Tumorexpression von B7-H3 und B7-H4 betragen jeweils 7,0 und für die MHC1-Tumorexpression 4,0.

Die Überlebenskurve in Abbildung 34A zeigt ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben ($p = 0,0325$) bei Patienten mit hoher MHC1-Tumorexpression (MHC1 high Tumor) im Vergleich zu solchen mit niedriger MHC1-Tumorexpression (MHC1 low Tumor). Unter Patienten mit einer starken tumoralen B7-H3-Expression ist ein Vitamin-D-Mangel (VDM) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) assoziiert ($p = 0,0037$, Abb. 34B). Eine Tendenz zu einem geringfügigen Überlebensvorteil bei HNSCC-Patienten mit hoher tumoraler PD-L1-Expression (PD-L1 high Tumor) im Vergleich zu solchen mit niedriger tumoraler PD-L1-Expression (PD-L1 low Tumor) wird aus Abb. 34C ersichtlich ($p = 0,1834$). Weiterhin scheint eine tumorale Infiltration mit stark CD80-positiven Leukozyten (CD80 high peritumorale Leukozyten) ebenfalls prognostisch vorteilhaft für HNSCC-Patienten zu sein ($p = 0,2112$, Abb. 34D). Bei den untersuchten HNSCC-Patienten beeinflusste das Ausmaß der CD80-Expression auf intratumoralen Leukozyten und Tumorzellen das Gesamtüberleben nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte sich kein Überlebensvorteil in Abhängigkeit von der tumoralen B7-H3- und B7-H4-Expression (Daten nicht gezeigt).

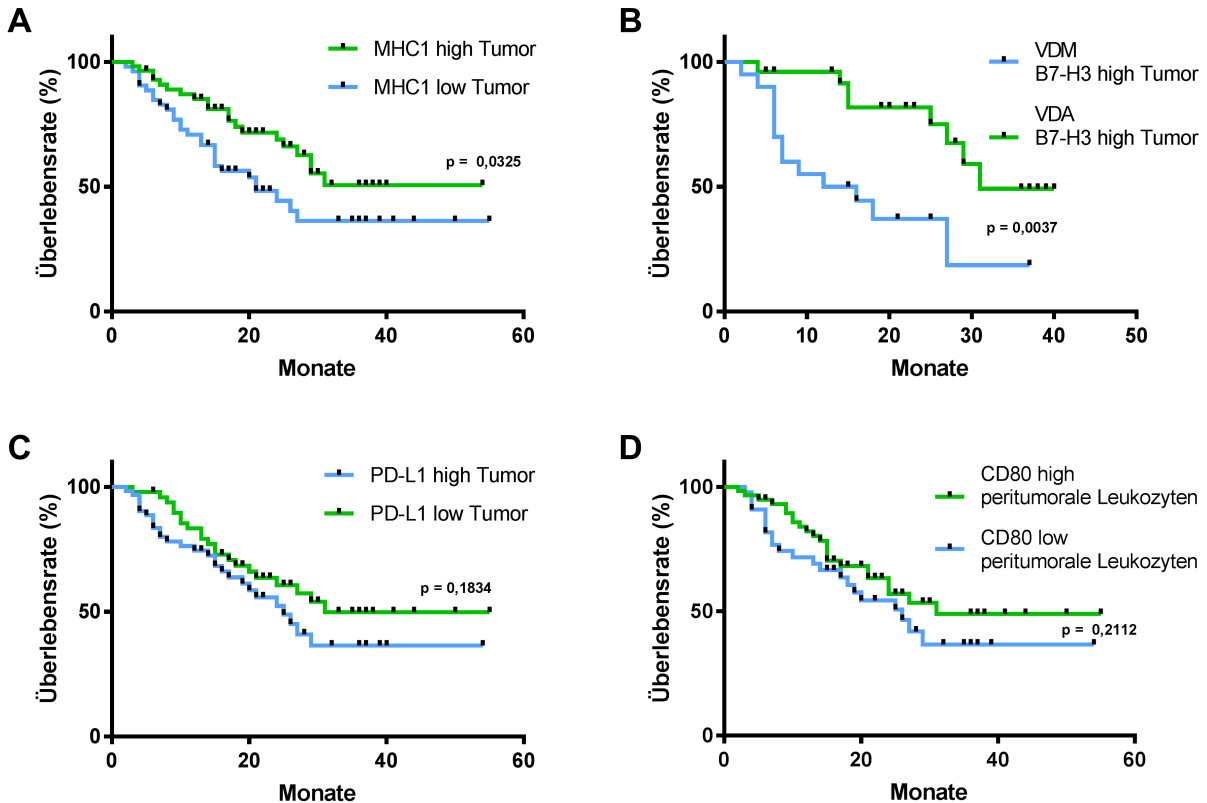


Abb. 34: Einfluss des Vitamin-D-Status und der Immunrezeptorexpression auf das Gesamtüberleben bei HNSCC-Patienten. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der tumoralen MHC1-(A) und PD-L1-Expression (C), sowie von der peritumoral-leukozytären CD80-Expression-Status (D). Zudem wurde das Gesamtüberleben von Tumorpatienten mit hoher tumoraler B7-H3-Expression in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status verglichen (B). Zensierte Daten wurden durch schwarze Punkte symbolisiert. VDA (ausreichende Vitamin-D-Versorgung); VDM (Vitamin-D-Mangel); high (starke Proteinexpression); low (geringe Proteinexpression).

Bei genauerer Betrachtung der Überlebensdaten im Kontext mit der tumoralen PD-L1-Expression und dem Vitamin-D-Status lässt sich folgendes feststellen: Unter HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung besteht eine deutliche Tendenz zu einem verbesserten Gesamtüberleben ($p = 0,0613$, Abb. 35B), wenn eine niedrige PD-L1-Expression (VDA PD-L1 low Tumor) vorliegt im Vergleich zu Patienten mit hoher tumoraler PD-L1-Expression (VDA PD-L1 high Tumor). Diese Tendenz konnte jedoch bei Patienten mit Vitamin-D-Mangel nicht nachgewiesen werden ($p = 0,5815$, Abb. 35A). Zwischen Vitamin-D-Mangel-Patienten mit hoher tumoraler PD-L1-Expression (VDM PD-L1 high Tumor) und Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung und niedriger PD-L1-Tumorexpression (VDA PD-L1 low Tumor) liegt ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben vor ($p = 0,0137$, Abb. 35C).

Ergebnisse

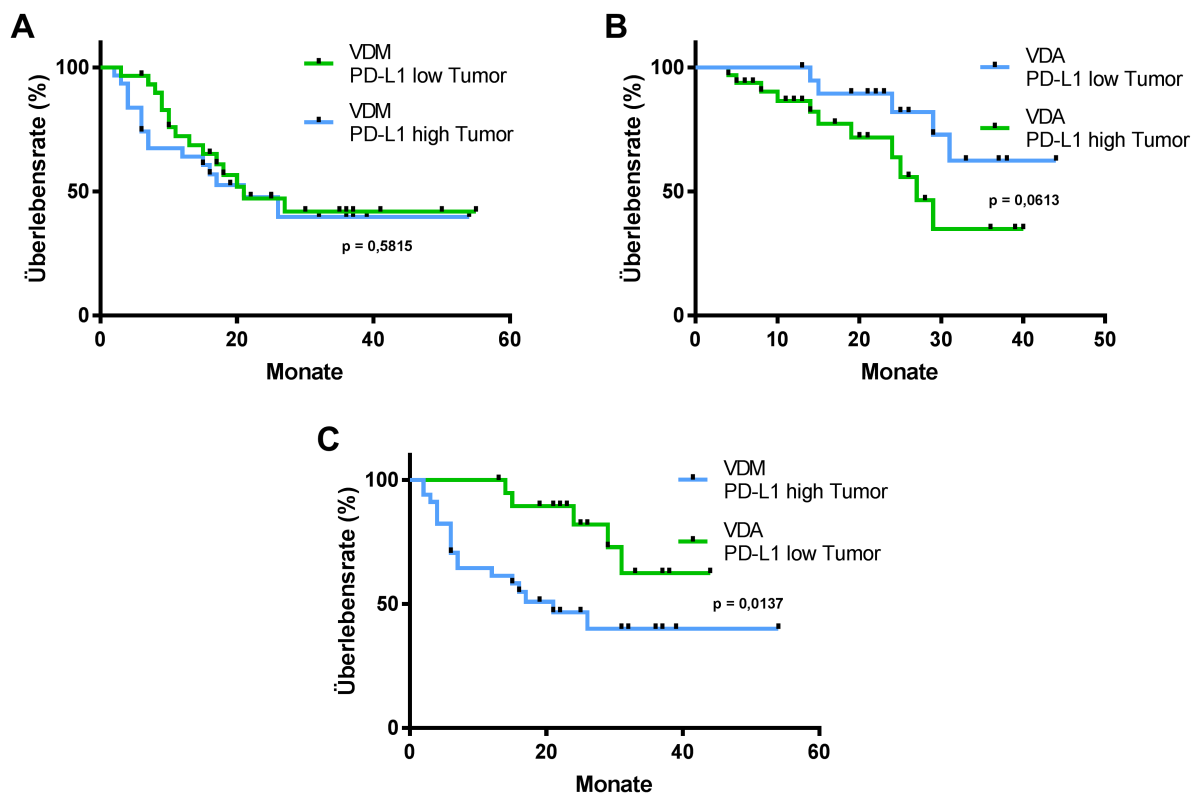


Abb. 35: Einfluss des Vitamin-D-Status und der tumoralen PD-L1-Expression auf das Gesamtüberleben bei HNSCC-Patienten. In Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurde das Gesamtüberleben zwischen Patienten mit Vitamin-D-Mangel und hoher tumoraler PD-L1-Expression (VDM PD-L1 high Tumor) und Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung und niedriger PD-L1-Tumorexpression (VDA PD-L1 low Tumor) verglichen (C). Des Weiteren wurde das Gesamtüberleben von Tumorpatienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (B) bzw. Vitamin-D-Mangel (A) in Abhängigkeit von der PD-L1-Tumorexpression verglichen. Zensierte Daten wurden durch schwarze Punkte symbolisiert. VDA (ausreichende Vitamin-D-Versorgung); VDM (Vitamin-D-Mangel); high (starke Proteinexpression); low (geringe Proteinexpression).

4.6 Analyse der Immunrezeptorexpression in der FaDu-Zelllinie

Zur Analyse der Proteinexpression von CD80, MHC1, PD-L1, B7-H3 und B7-H4 in der HNSCC-Zelllinie FaDu als Vorbereitung weiterführender funktioneller Untersuchungen der Arbeitsgruppe auf Basis der zuvor dargestellten Ergebnisse wurden die Zellen gemäß dem in 3.3.1 erläuterten Vorgehen in getrennten Zellkulturflaschen kultiviert und entsprechende aufbereitete Wildtyp-Zellproben durchliefen im Anschluss eine SDS-Gel-Elektrophorese (vgl. 3.4.2). FaDu-Zellproben wurden unter Einwirkung von 1 ml Trypsin-EDTA, 2 ml Trypsin-EDTA, 5 ml Accutase®, 2,5 ml TrypLE™ Select, 2,5 ml Papain-Lösung oder mittels Zellscraper generiert. Die im SDS-Gel aufgetragene Zellmenge lag bei durchschnittlich 200 000 Zellen pro Lauffront für die erste Versuchsreihe. In den nachfolgenden Versuchen wurden etwa 250 000 Zellen pro Lauffront im SDS-Gel aufgetragen. Abschließend erfolgte ein Western Blot (vgl. 3.4.3) mit nachfolgender immunologischer Detektion der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf der PVDF-Membran (vgl. 3.4.4). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die initiale Kultivierung der FaDu-Zellen erfolgte regelmäßig unter Verwendung von 1ml Trypsin-EDTA als Zelldissoziationsmittel. Die so geernteten Zellen wurden anschließend in sechs separate Zellkulturflaschen ausgesät und danach jeweils getrennt mit unterschiedlichen

Ergebnisse

Zelldissoziationsmethoden behandelt. Um zu eruieren, ob die Serinprotease Trypsin einen Effekt auf die Proteinexpression der zu untersuchenden Immunrezeptoren ausüben könnte, wurden einige Zellen mit 1 ml und 2 ml Trypsin-EDTA im Rahmen des Zellsplittings behandelt und im Abstand von 72 h geerntet. Weitere Zellen wurden mittels Zellscraper im zeitlichen Abstand von 72 h sowie 144 h nach der letzten Trypsin-Behandlung mechanisch dissoziiert und als nicht-enzymatisch-dissoziierte Vergleichsproben herangezogen. In Abbildung 36 ist der zu dieser Versuchsreihe zugehörige Western Blot für die Detektion von PD-L1 dargestellt. Banden, welche mit der Proteinexpression von CD80, MHC1, B7-H3 und B7-H4 assoziiert wären, konnten in der durchgeführten Versuchsreihe nicht detektiert werden.

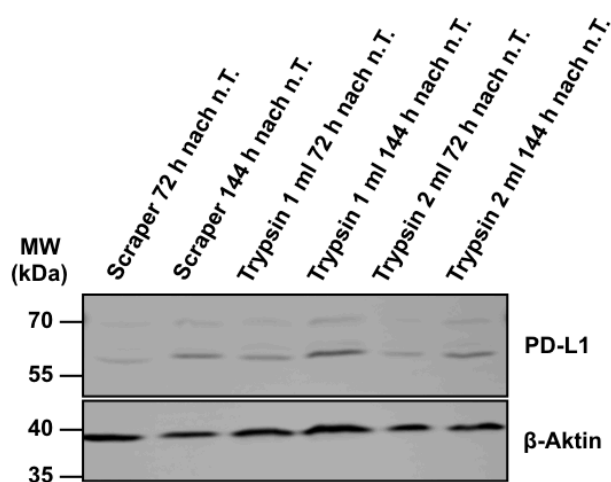


Abb. 36: Darstellung der Proteinexpression von PD-L1 in FaDu-Zellen anhand des Western Blot-Verfahrens. MW (Molekulargewicht in kDa); n.T. (nach initialer Trypsinbehandlung der FaDu-Zellen, die für die Aufteilung auf die einzelnen Zellkulturflaschen notwendig war); WT (Wildtyp).

In den nachfolgenden Zellkulturversuchen wurde zusätzlich die Proteinexpression der oben genannten Immunrezeptoren unter dem Einfluss alternativer Zelldissoziationsmethoden (Accutase®, TrypLE™ Select, Papain) an der FaDu-Zelllinie untersucht, um auszuschließen dass durch die Behandlung der Zellen mit Trypsin die gesuchten Proteine auf Grund eines enzymatischen Abbaus nicht im Western Blot delektiert werden konnten. Es erfolgte der Vergleich mit Proben trypsinierter FaDu-Zellen, einer durch Behandlung mit TrypLE™ Select generierte HeLa-Wildtyp-Zellprobe, einer mittels Trypsin generierte MCF-7-Wildtyp-Zellprobe und rauen Mikrosomen (RM). Die MCF-7- und RM-Proben (Negativkontrolle) wurden vom Institut für Biochemie & Molekularbiologie der Universität des Saarlandes bezogen. Der entsprechende Western Blot ist in Abbildung 37 für die Detektion von PD-L1 gezeigt. Im Western Blot konnten keine Banden, welche mit der Proteinexpression von CD80, MHC1, B7-H3 und B7-H4 in Verbindung gebracht werden könnten, nachgewiesen werden.

Ergebnisse

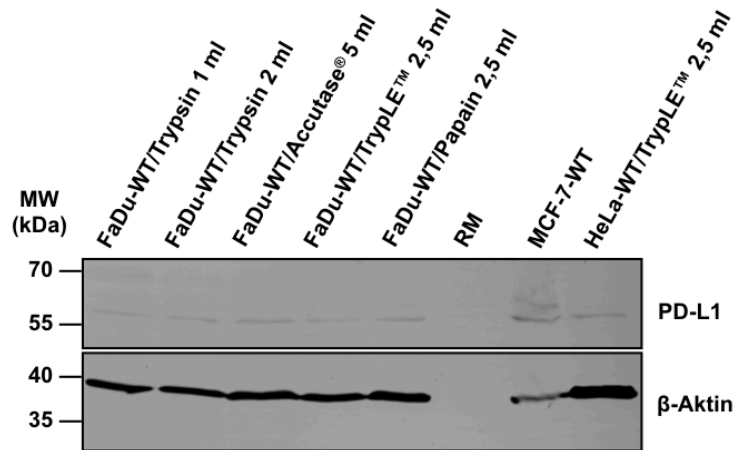


Abb. 37: Darstellung der Proteinexpression von PD-L1 in FaDu-, HeLa- und MCF-7-Zellproben anhand des Western Blot-Verfahrens. RM (raue Mikrosomen); MW (Molekulargewicht in kDa); WT (Wildtyp).

Bis auf PD-L1 und die Ladekontrolle β -Aktin konnten in beiden Versuchsreihen keine abgrenzbaren Bandensignale im Western Blot erfasst werden (vgl. Abb. 36 & Abb. 37). Im Falle von PD-L1, wo eine Bande bei 33 kDa zu erwarten gewesen wäre, konnten in der ersten Versuchsreihe (Abb. 36) etwa 3 schwache Banden in den meisten Lauffronten nachgewiesen werden: Eine Hauptbande bei etwa 60 kDa und 2 weitere schwächere Banden bei 65 kDa bzw. 70 kDa. Im Western Blot der zweiten Versuchsreihe (Abb. 37) war in allen Proben bis auf die rauen Mikrosomen und MCF-7-WT eine PD-L1-assoziierte Band zu sehen. Hinsichtlich der MCF-7-WT-Probe konnten 2 Banden für PD-L1 bei etwa 60 kDa und 65 kDa identifiziert werden.

5. Diskussion

5.1 Relevanz von Vitamin-D und dem therapeutischen Konzept der Immun-Checkpoint-Blockade in der Kopf-Hals-Onkologie

In Anbetracht der zukünftigen medizinischen Herausforderungen werden die wissenschaftlichen Bemühungen um effizientere adäquate Therapieoptionen und fortschrittlichere diagnostische Maßnahmen von Tumorerkrankungen immer relevanter werden, da durch den demographischen Wandel mit dem Überwiegen älterer zunehmend multimorbider Menschen in den folgenden Jahren eine Inzidenzzunahme von bösartigen Tumorerkrankungen zu erwarten ist. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs (HNSCC) zählen als sechst häufigste Tumorentität zu den führenden Tumorerkrankungen weltweit und können noxeninduziert oder nach Infektion mit „high-risk“ humanen Papillomaviren entstehen. Die multimodale Therapie von Kopf-Hals-Tumorerkrankungen gestaltet sich trotz der Einführung bzw. klinischen Entwicklung einiger innovativer Therapeutika, wie dem EGFR-Antikörper Cetuximab und den Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, weiterhin schwierig, was sich in der nahezu unverändert niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 55% widerspiegelt (Mandal et al. 2016). Eine effektive und nebenwirkungsarme Tumorthherapie ist oft nur eingeschränkt möglich, da durch die molekularbiologische Heterogenität der Tumoren sowie die tumorvermittelten immunevasiven Mechanismen und die generelle Immunsuppression, die im Rahmen von Kopf-Hals-Tumor-Patienten häufig vorliegt, eine Tumorprogression schwer verhindert werden kann.

Die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren geht weniger von einem einzelnen Zelltyp aus, sondern wird von multiplen Einflüssen in der komplexen Tumormikroumgebung gesteuert: Dabei sind insbesondere parakrine Interaktionen zwischen Stroma und Immunzellen sowie metabolische Veränderungen für die Kanzerogenese und Tumorprogression ausschlaggebend. Zelluläre Elemente der Tumormikroumgebung coevolvierten mit dem Tumor, wobei bestimmte Zellen des Immunsystems abnorme Phänotypen ausbilden können als Resultat einer fehlorganisierten Reaktion auf die Kanzerogenese, welche wiederum pleiotrope Effekte der Tumorzellen, wie Angiogenese und Tumorinvasion unterstützen. Innovative Tumortherapiekonzepte zielen insbesondere auf das menschliche Immunsystem und dessen Potenz zur immunologischen Reaktion gegen den Tumor ab: Zahlreiche wissenschaftliche Beiträge zur Molekularbiologie von Tumoren und deren Interaktionsverhalten mit dem körpereigenen Immunsystem deuten auf tumorinduzierte Mechanismen zur Hemmung der Anti-Tumor-Immunreaktion hin, welche konsekutiv eine von der immunologischen Kontrolle entkoppelte Tumorprogression begünstigen. Regulatorische T-Zellen (TREG), tumorassoziierte Makrophagen (TAM) und myeloide Suppressorzellen (MDSC) können die Entwicklung und Progression von Tumoren unterstützen (Chen & Mellman 2013). Aus diesem Grunde werden aktuell in zahlreichen klinischen und experimentellen Studien vielfältige immunonkologische Therapieansätze erprobt, die prinzipiell zweierlei erreichen sollen: Zum Einen soll die tumorprogressions-fördernde Komponente des Immunsystems funktionell aufgehoben werden, zum Anderen die tumorhemmenden Effekte des

Immunsystems gezielt verstärkt werden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen chemo- bzw. radiotherapeutischen Konzepten ist eine Immuntherapie meist mit einer deutlich geringeren therapieassoziierten Langzeittoxizität verbunden. Weiterhin ist ein immuntherapeutischer Ansatz charakterisiert durch eine gewisse dynamische Komponente, insofern als die Immunantwort mit der Tumorerkrankung coevolviert (Rapidis & Wolf 2009).

Tumorzellen können im Körper anhand humoraler sowie zellulärer Mechanismen und durch Veränderung der eigenen Oberflächenrezeptoren die immunologische Antwort gegen den Tumor modulieren, indem sie die Aktivität von Effektorzellen kontrollieren. Immun-Checkpoint-Moleküle, welche sowohl auf Tumorzellen als auch auf Zellen des Immunsystems variabel exprimiert sein können, sind dabei zentral an der Regulation des Immunevasionsgeschehens beteiligt: Diese werden in der Tumormikroumgebung von Tumorzellen ausgenutzt um insbesondere T-Effektor-Lymphozyten funktionslos zu machen und damit der Immunantwort zu entkommen (Ferris 2015). Durch sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibitoren wird an dieser Stelle versucht die malignominduzierte verminderte Reaktivität des Immunsystems gegenüber Tumorzellen wieder aufzuheben, indem immuninhibierende Interaktionen gezielt blockiert werden um somit die Anti-Tumor-Immunantwort, welche im wesentlichen durch T-Zellen und NK-Zellen vermittelt wird, funktionell aufrecht zu erhalten bzw. zu verstärken (Topalian et al. 2015). Problematisch bleibt allerdings in vielen Fällen die Tatsache, dass die meisten aktuell zugelassenen Immun-Checkpoint-Inhibitoren nicht bei allen Tumoren wirksam sind und durch die molekulare Heterogenität hinsichtlich der Expression von Zielantigenen die Anwendbarkeit erheblich eingeschränkt sein kann. Hierbei hängt das Therapieansprechen zum Einen von zahlreichen tumorintrinsic Faktoren, wie beispielsweise der Mutationslast oder einer gestörten Antigenexpression, zum Anderen aber auch von extrinsischen Faktoren, zu denen Tumorumaskularisierung, chronische Inflammation und der Immunstatus des Patienten zählen, ab. Einschränkend muss erwähnt werden, dass der klinische Erfolg einer Immun-Checkpoint-Blockade, das ausreichende Vorhandensein des jeweiligen Zielantigens vorausgesetzt, von den Komorbiditäten der Patienten sowie dem Einfluss einer Strahlen- und Chemotherapie abhängt, da unter Berücksichtigung dieser Einflussfaktoren nur wenige Patienten für eine solche Therapie primär in Frage kommen und aufgrund der nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen autoimmunen Ausmaßes ein Therapieabbruch als Konsequenz oftmals erfolgen muss (Laban et al. 2015). Jedoch konnten Studien demonstrieren, dass für geeignete Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium bei denen eine Immun-Checkpoint-Therapie erfolgreich eingesetzt wird, diese im Vergleich zur Standardtherapie einen besseren Therapieansprechen bietet (Ferris et al. 2016). Da sich eine Immun-Checkpoint-Therapie sehr kostenintensiv gestaltet, sollten zukünftig nicht-invasive effektive Maßnahmen getroffen werden, um Patienten, die am ehesten von einer Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren profitieren könnten, gezielt und rechtzeitig zu identifizieren. Die hochrangige Bedeutung einer gestärkten endogenen Immunabwehr zur Primärprävention von Tumorerkrankungen, insbesondere solchen mit stark immunsuppressivem Profil wie HNSCCs (Mandal et al. 2016), erfordert in Zukunft

weitere klinische und experimentelle Forschungsansätze zur Entdeckung oder Herstellung von potentiellen immunsupportiven Substanzen. Eine Hauptaufgabe wird es daher sein alternative Behandlungsstrategien zu entwickeln um die Subgruppe an Patienten, für die eine Immuntherapie in Frage kommen könnte, besser identifizieren zu können.

Neben exogenen medikamentenvermittelten Immunmodulationsstrategien, existieren auch endogene Stimulationsfaktoren des Immunsystems, wie beispielsweise das Steroidhormon Vitamin-D: Neben den charakteristischen physiologischen Eigenschaften, zu denen im Wesentlichen die Steuerung der Calcium/Phosphat-Homöostase im Rahmen des Knochenstoffwechsels zählt, konnte in zahlreichen Studien immunmodulatorische Funktion des Vitamin-D belegt werden (Kongsbak et al. 2014, Prietl et al. 2013). Zudem exprimieren zahlreiche Immunzellpopulationen einen Vitamin-D-Rezeptor, über den Differenzierungsvorgänge reguliert werden können (Bouillon et al. 2008, Yu & Cantorna 2008).

Diese immunsupportive und antiinflammatorische Wirkung von Vitamin-D macht sich auch bei malignen Tumorerkrankungen bemerkbar, wo Publikationen in prospektiven und retrospektiven Studien zeigen konnten, dass ein um 30%-50% erhöhtes Risiko für die Entstehung von Colon-, Prostata-, und Mammakarzinomen und eine höhere Mortalität dieser Tumorentitäten mit einem 25-OH-Vitamin-D-Spiegel unter 20 ng/ml einher ging (Giovannucci et al. 2006, Feskanich et al. 2004, Garland et al. 2006). Einige Studien konnten eine ähnliche Tendenz bei Kopf-Hals-Tumoren bestätigen (Fanidi et al. 2016, Moukayed & Grant 2017, Afzal et al. 2013) und beobachteten zudem eine erhöhte Inzidenz von Tabak-assoziierten Tumorentitäten unter Vitamin-D-Mangel. In tierexperimentellen Versuchen, worin durch orale Gabe von 7,122 Dimethylbenzanthrazen (DMBA) ein Tumorwachstum in der Wangenschleimhaut von Hamstern provoziert wurde, supprimierte eine Vitamin-D-Substitution signifikant die Tumorentstehung und verzögerte die Zeit bis zur Entwicklung eines Tumors (Meier et al. 2007). Weiterhin auffällig ist die beachtlich höhere Inzidenz eines Vitamin-D-Mangels unter HNSCC-Patienten, was in einer epidemiologischen Studie von Orell-Kotikangas et al. ermittelt wurde: Bei fast zwei Drittel der untersuchten Kopf-Hals-Tumor-Patienten konnte ein Vitamin-D-Spiegel von ≤ 50 ng/ml nachgewiesen werden (Orell-Kotikangas et al. 2012). Bochen et al. konnten in verschiedenen experimentellen und klinischen Untersuchungen zeigen, dass ein Vitamin-D Mangel unter HNSCC Patienten häufig mit einer verstärkten lymphogenen Metastasierung, einem negativen HPV-Status und einem geringeren Gesamtüberleben einherging (Bochen et al. 2018). Zudem zeigte sich bei diesen Patienten in immunhistochemischen Analysen eine signifikant geringere intra- und peritumorale Immunzellinfiltration im Tumorgewebe. Eine Beeinflussung des Immunsystems von HNSCC-Patienten durch Vitamin-D wurde bereits in anderen Studien beschrieben: Walsh et al. konnten im Rahmen von immunhistochemischen Untersuchungen des Immunzellinfiltrates von 32 HNSCC-Patienten von denen 16 mit Vitamin-D substituiert wurden zeigen, dass durch eine Vitamin-D-Substitution eine vermehrte Infiltration der peritumoralen Tumorbereiche mit CD42 und CD8(+)-T-Zellen sowie CD68(+) und damit aktivierten T-Zellen erzielt werden konnte (Walsh et al. 2010). In einer weiteren Studie wurden 35 HNSCC-Patienten mit 1,25-(OH)₂-Vitamin-D behandelt und es konnte gezeigt werden, dass hierdurch der Anteil proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-10 und IFN- γ im Tumorgewebe im Vergleich zu den 18 nicht-substituierten HNSCC-

Patienten gesteigert werden konnte (Walker et al. 2012).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse den positiven Einfluss von Vitamin-D auf die Immunantwort und die Prognose bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten. Die nebenwirkungsarme und kostengünstige Möglichkeit der Vitamin-D-Substitution stellt daher zukünftig einen vielversprechenden immunstimulativen Behandlungsansatz im Rahmen eines multimodalen Therapie-konzeptes bei Kopf-Hals-Tumorpatienten dar.

Wenige Studien zur Bedeutung des Vitamin-D-Status bei Kopf-Hals-Tumorpatienten konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer eigenen Arbeitsgruppe keine prognostische Relevanz einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung im Hinblick auf Erkrankungshäufigkeit und Gesamtüberleben nachweisen (Meyer et al. 2011, Arem et al. 2011). Jedoch bestärken zahlreiche Studien eine positive Korrelation zwischen einem physiologischen Vitamin-D-Status und einer geringeren Mortalitätsrate bei HNSCC-Patienten (Vaughan-Shaw et al. 2017, Prietl et al. 2013, Young & Day 2013, Gugatschka et al. 2011, Baeke, Takiishi, et al. 2010). Ein Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Resultate könnten statistische Verzerrungen der Studienergebnisse durch potenzielle Fehlerquellen darstellen, zu denen insbesondere Unterschiede in der Risikofaktorexposition (Tabak und Alkohol), der Sonnenexpositions-dauer, den geographischen Verhältnissen, dem HPV-Status und der Lebensgewohnheiten der Patienten zählen. Weiterhin nehmen die oben genannten Studien Bezug auf retrospektive Daten mit eingeschränkten Fallzahlen und verzichten auf molekularbiologische Untersuchungen. Die von Manson et al. durchgeführte randomisierte, Placebo-kontrollierte VITAL-Studie untersuchte bei 25 817 US-Amerikanischen Probanden ohne Tumor- und Herz-Kreislauf-erkrankungen in der Anamnese, ob eine tägliche Substitution von 2000 IU Vitamin-D₃ und 1 g Omega-3 Fettsäuren Auswirkungen auf die Inzidenz und Mortalität von Tumoren und kardiovaskulären Ereignissen haben könnte. Die Studie kam zum Schluss, dass unter einer Vitamin-D-Substitution bei einem medianen Follow-up von 5,3 Jahren keine signifikante Abnahme der Tumorinzidenz festzustellen war (Manson et al. 2018). In Bezug auf die Tumorsterblichkeit konnte ein geringer aber positiver Effekt unter Vitamin-D-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet werden (Hazard ratio 0,83 (95% CI 0,67-1,02)). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass 87,3% der 15 787 Probanden, bei denen der 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel bestimmt wurde, vor Substitutionsbeginn Ausgangswerte von über 20 ng/ml, also per Definition keinen Vitamin-D-Mangel, aufwiesen. Da bei der Mehrzahl der deutschen Bevölkerung mit einem signifikanten Vitamin-D-Mangel gerechnet werden kann, und ein erhöhtes Malignomrisiko erst bei einem 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von deutlich unter 30 ng/ml zu erwarten wäre (Giovannucci et al. 2006, Feskanich et al. 2004, Garland et al. 2006), sind die in der Studie getroffenen Aussagen hinsichtlich der protektiven Wirkung und prognostischen Relevanz von Vitamin-D im Kontext von Tumorerkrankungen kritisch zu betrachten.

5.2 Vitamin-D- und HPV-Status - Einfluss auf die Immunrezeptorexpression und Prognose bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sowie therapeutische Implikationen

Eine gesteigerte Immunzellinfiltration, beispielsweise induziert durch Vitamin-D-Substitution (Bochen et al. 2018), ist entscheidend für das Therapieansprechen einer Immun-Checkpoint-Blockade, dessen Effektivität maßgeblich von der Präsenz immunologischer Effektorzellen im intra- und peritumoralen Stroma und somit von dem Ausmaß der blockierten Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzelle abhängig ist. Jedoch ist wenig bekannt über potentielle biologische Effekte der Vitamin-D-Signaltransduktion auf den immunologischen Cross-Talk zwischen Tumorzellen und Effektorzellen der unspezifischen oder spezifischen Immunantwort. An dieser Stelle kommt die Frage auf, inwiefern Vitamin-D einen Effekt auf solche immunmodulatorische Prozesse vermittelt über Immun-Checkpoint-Molekül-Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen haben könnte: Hilft eine hohe Vitamin-D-Versorgung die Immunescape-Mechanismen des Tumors zu umgehen? Es bleibt zu eruieren, ob ein Unterschied im Verhalten einer Immunzelle gegenüber einem tumorassoziierten Antigen in Abhängigkeit von verschiedenen Vitamin-D-Serumspiegeln besteht und wie immunologisch aktiv tumorinfiltrierende Leukozyten von Vitamin-D-Mangel-Patienten, im Vergleich zu solchen von Tumorpatienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung, sind. In dieser Hinsicht wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Vitamin-D als potentieller Modulator von Immunzell-Tumor-Interaktionen bei Kopf-Hals-Tumoren auf molekularer Ebene untersucht: Ziel war es den Einfluss von Vitamin-D auf das Expressionsverhalten einer Auswahl von Immun-Checkpoint-Molekülen sowohl auf Tumorzellen als auch Zellen des körpereigenen Immunsystems näher zu charakterisieren. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen von Patiententumorgewebe aus einem 112 HNSCC-Patienten umfassenden Kollektiv für fünf verschiedene Antikörper durchgeführt, welche im Anschluss semiquantitativ ausgewertet wurden. Letztlich wurden insgesamt um die 1000 Präparate immunhistochemisch gefärbt, zu denen neben den Antikörperfärbungen, welche anhand eines im Vorfeld etablierten Versuchsprotokolls angefertigt wurden, weiterhin Positiv- und Negativkontrollen und Schnitte im Rahmen der Etablierungsversuche zählen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die verwendeten Antikörper primär aber nicht ausschließlich Tumor- oder Immunzellen anfärben, da die jeweiligen Zielstrukturen nicht hundertprozentig spezifisch für die entsprechenden Zellpopulationen sind. Weiterhin wurden die immunhistochemischen Färberesultate auf eine mögliche Korrelation mit dem HPV-Status der untersuchten Tumorpatienten untersucht. Zu den untersuchten Markern zählten die Immun-Checkpoint-Moleküle CD80, B7-H3, B7-H4 und PD-L1 sowie der Proteinkomplex MHC1. Bis auf MHC1, lassen sich diese Markerproteine grob in co-stimulierende und co-inhibierende Moleküle funktionell einteilen, wobei diese Eigenschaften stark vom Tumormikromilieu, den entsprechenden Zielrezeptoren und deren Zielzellen abhängen: CD80, welches auf Tumorzellen, DCs, Makrophagen und einigen Leukozytentypen vorkommt, agiert überwiegend über CD28 stimulierend auf T-Zellpopulationen und steigert bei hoher tumoraler Expression damit die Tumorimmunogenität (Chen 2004). Jedoch kann CD80 durch Interaktion mit

CTLA-4 auch immuninhibierend wirken und somit ein Immunescape ermöglichen. Im Gegensatz zu CD28 bindet CTLA-4 CD80 mit einer wesentlich höheren Affinität (Chen & Flies 2013). Lang et al. konnten nachweisen, dass in humanen HNSCC-Zelllinien ein Mangel von CD80 ursächlich für die beeinträchtigte T-Zell-Aktivierung ist (Lang et al. 1999). Eine hohe tumorale CD80-Expression korrelierte bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom mit einem verbesserten Gesamtüberleben (Chang et al. 2007) und schränkte in einem experimentellen Mausmodell die Tumorprogression von Oropharynx Tumoren ein (Thomas & Wen 2006). In experimentellen Untersuchungen zum kolorektalen Karzinom konnten Tirapu et al. demonstrieren, dass das Ausmaß der tumoralen CD80-Expression für die immunologische Kontrolle der Tumorprogression entscheidend ist: Niedrige CD80-Spiegel bzw. eine Runterregulation der CD80-Expression auf malignen Zellen begünstigten eine Immunevasion durch präferentielle Bindung von CTLA-4, da aufgrund der höheren Affinität von CTLA-4 zu CD80 ein kompetitiver Vorteil gegenüber CD28 besteht (Tirapu et al. 2006).

B7-H3 (CD276) reguliert die T-Lymphozytäre- bzw. NK-Zell Aktivität und die Zytokinproduktion von zytotoxischen T-Zellen durch sowohl co-inhibitorische als auch co-stimulierende Effekte per Interaktion mit einem nicht eindeutig charakterisierten Zielrezeptor (Chen et al. 2004, Yi & Chen 2009). Neueste Studien berichten über eine Korrelation der tumoralen B7-H3-Expression mit einer ungünstigeren Prognose in manchen Tumorentitäten, unter anderem auch HNSCC: Eine antikörpervermittelte Blockade von B7-H3 im Mausmodell resultierte in einer reduzierten Aktivität von immun-suppressiven Zelltypen, wie MDSCs und TAMs und steigerte die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten in der Tumormikroumgebung (Mao et al. 2017). Zielgerichtete Antikörper gegen B7-H3 mit potentieller Anti-Tumor-Aktivität sind aktuell in Entwicklung (Loo et al. 2012).

PD-L1, welches neben dem Vorkommen auf aktivierten Lymphozyten und einigen APCs in HNSCCs und weiteren Tumorzelllinien überexprimiert ist, induziert über PD-1 einen Funktionsverlust bzw. eine Apoptose von tumorinfiltrierenden T-Effektorzellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen und ist an der Immuntoleranzentwicklung beteiligt (Zandberg et al. 2014). Zudem stimuliert PD-L1 die de novo Differenzierung und Aktivierung regulatorischer T-Zellen (TREGs), sodass hierdurch eine effektive Reduktion des Verhältnisses inflammatorischer zu anti-inflammatorischen Zytokinen erreicht wird (Zandberg et al. 2014). Gerade die physiologischen protolerogenen Effekte des PD-1/PD-L1-Signallings werden von vielen Tumorentitäten, inklusive HNSCCs, im Zuge des Immunescares ausgenutzt (Lechner et al. 2017, Ferris 2015). Eine erhöhte PD-L1-Expression auf Tumoren und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) geht meist mit einer schlechteren Prognose, einer gesteigerten tumoralen Progression und einer erhöhten Metastasierungsrate einher (Zandberg et al. 2014). Ergebnisse aktueller Metaanalysen deuten auf eine klar positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der PD-L1-Tumorexpression und dem klinischen Ansprechen einer PD-1-Immun-Checkpoint-Blockade hin, welches nochmals die entscheidende Bedeutung des Verständnis über PD-L1-Expressions regulierende Signaltransduktionswege untermauert (Zhang et al. 2016). B7-H4, ein weiteres inhibitorisches Checkpoint-Molekül, welches im Wesentlichen auf Tumorzellen, tumorassoziierten Immunzellen und APCs vorkommt, agiert als potenter T-Zell-Suppressor und begünstigt Tumorinvasion und Metastasierung in zahlreichen Tumorentitäten, zu denen auch Kopf-Hals-Tumoren zählen (MacGregor & Ohashi 2017). Eine hohe tumorale B7-H4-

Expression dient als Indikator für eine schlechte Prognose in HNSCC-Patienten und geht oft mit einer niedrigen tumoralen T-Zell-Infiltration einher (Wu et al. 2016, Zou 2005). Derzeit werden in klinischen Phase-1-Studien therapeutische Antikörper gegen B7-H4 getestet (MacGregor & Ohashi 2017).

Bei einer Anti-Tumor-Immunreaktion (siehe 2.4.1) agieren neben NK-Zellen auch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten als entscheidende Effektorzellen (Ferris 2015). Aufgrund aktuell vorliegender wissenschaftlicher Daten zu einer gesteigerten NK-Zell- Aktivität unter Vitamin-D-Einfluss (Bochen et al. 2018, Yu & Cantorna 2008) ergab sich an dieser Stelle die Frage, ob auch Vitamin-D Auswirkungen auf die Effektivität einer zytotoxischen T-lymphozytären Immunantwort haben könnte. Daher wurde neben den oben genannten Immun-Checkpoint-Molekülen zusätzlich eine Analyse der MHC1-Expression auf Tumorzellen vorgenommen. MHC1 wird auf allen kernhaltigen Zelltypen im menschlichen Körper auf der Zelloberfläche in einem bestimmten Verhältnis exprimiert und vermittelt eine Selbsttoleranzentwicklung von körpereigenen Zellen durch Interaktion mit T-Zellen. Tumorzellen sind jedoch in der Lage ihre eigene MHC1-Expression durch Mutationen in HLA-Allelen sowie Störungen der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie zu modifizieren und runterzuregulieren (Ferris 2015, López-Albaitero et al. 2006), sodass dadurch der immunologische Erkennungsprozess durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welcher von fundamentaler Bedeutung für die Bekämpfung bzw. Eliminierung entarteter Zellen ist, beeinträchtigt wird (Mandal et al. 2016). Dieser Vorgang wird von Tumorzellen neben Immun-Checkpoint-Molekül-Interaktionen als Immunevasionstrategie ausgenutzt.

Die semiquantitativen Auswertungsergebnisse der immunhistochemischen Analysen bestätigten die vermutete positive Korrelation zwischen einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel (VDA) bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und einer verstärkten Expression stimulierender Immun-Checkpoint-Moleküle auf den Tumorzellen im Sinne eines immunstimulativen, antitumoralen Einfluss des Vitamin-D: Es zeigte sich im Vergleich zu Vitamin-D-Mangel-Patienten (VDM) eine deutliche Tendenz zur gesteigerten tumoralen Expression von CD80 im VDA-Kollektiv ($p = 0,0707$). Bei Betrachtung des Ausmaßes der leukozytären CD80 Expression wird eine ähnlich klare Tendenz ersichtlich: VDA-Patienten exprimierten im Vergleich zu VDM-Patienten vermehrt CD80 auf peritumoralen Leukozyten. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p = 0,0324$). Für die intratumoral-leukozytäre CD80-Expression konnte kein deutlicher Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,3533$). Aus der Überlebensanalyse bei den HNSCC-Patienten geht hervor, dass eine vermehrte peritumoral-leukozytäre CD80-Expression mit einem geringfügigen Überlebensvorteil ($p = 0,2112$) assoziiert ist. Eine gesteigerte tumorale bzw. intratumoral-leukozytäre CD80-Expression bietet hingegen keinen Überlebensvorteil (Daten nicht gezeigt). Sowohl auf tumoraler als auch auf leukozytärer Ebene lag keine Korrelation zwischen dem HPV-Status der Patienten und dem Ausmaß der CD80-Expression vor.

Bei der Evaluation der B7-H3-Immunhistochemie konnte interessanterweise eine positive Korrelation zwischen der tumoralen B7-H3-Expression und der Höhe des Vitamin-D-Serumspiegels verzeichnet

werden. Bei gutem Vitamin-D-Status waren deutlich mehr B7-H3- positive Tumorzellen anzufinden im Vergleich zu Patienten mit Vitamin-D-Mangel. Dieses Ergebnis war hochsignifikant ($p = 0,0052$). Jedoch beeinflusst das Ausmaß der tumoralen B7-H3-Expression das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten nicht (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigen Patienten mit hoher B7-H3-Tumorexpression und ausreichender Vitamin-D-Versorgung einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber solchen mit Vitamin-D-Mangel ($p = 0,0037$). B7-H3 wird auf mRNA-Ebene ubiquitär exprimiert, jedoch ist eine gesteigerte Proteinexpression meist in einem pathophysiologischen Zusammenhang auf Tumor- und tumorassoziierten Zellen gegeben. Eine hohe tumorale Expression geht in den meisten Fällen mit einem gesteigerten Immunevasions- und Invasionspotential von Tumorzellen einher. Interessanterweise zeigt die statistische Auswertung der B7-H3-Tumorexpression im Zusammenhang mit dem HPV-Status der HNSCC-Patienten eine signifikant gesteigerte tumorale B7-H3-Expression bei HPV-negativen Kopf-Hals-Tumorpatienten ($p = 0,0262$). Dies könnte womöglich ein Grund für die gesteigerte Aktivität und Anzahl tumorinfiltrierender T-Lymphozyten in HPV-positiven Tumoren sein: Katayama et al. konnten durch immunhistochemische Experimente demonstrieren, dass die tumorale B7-H3-Expression in Kopf-Hals-Tumoren invers korrelierte mit der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (Katayama et al. 2011). Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass B7-H3 in Abhängigkeit vom Tumormikromilieu, welches durch Vitamin-D moduliert wird, eher stimulierend oder inhibierend auf Immunzellen wirken kann und dass bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung durch die gesteigerte Immunezellinfiltration und den geringeren immunsuppressiven Prozessen in der Tumormikroumgebung möglicherweise eher die co-stimulatorischen Effekte überwiegen, sodass in diesem Fall eine hohe tumorale B7-H3-Expression die T-Zell-Aktivität steigern kann. Um die genaue Bedeutung von B7-H3 in der Kopf-Hals-Onkologie näher zu charakterisieren und mögliche Ursachen für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse zu entschlüsseln sind weitere molekulare Untersuchungen notwendig.

Bei Tumorpatienten mit einem Vitamin-D-Mangel war das inhibitorische Checkpoint-Molekül B7-H4 im Vergleich zu solchen mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung vermehrt auf Tumorzellen exprimiert. Somit lag hier eine deutliche Tendenz zu einer inversen Korrelation zwischen der Höhe Vitamin-D-Serumspiegels und der tumoralen B7-H4-Expression vor ($p = 0,0705$). Dies würden implizieren, dass ein ausreichender Vitamin-D-Spiegel eine Reduktion der tumorinduzierten Immunsuppression fördert und hierdurch letztlich auch eine Immunstimulation erreicht werden kann. Es konnte eine geringfügige Tendenz zu einer gesteigerten tumoralen B7-H4-Expression bei negativem HPV-Status ($p = 0,1332$) eruiert werden, was im Einklang mit der Tatsache steht, dass insbesondere HPV-negative HNSCCs durch ein stark immunsuppressives und mutationslastiges Tumormikromilieu mit einer geringeren Anzahl immunkompetenter Zellen gekennzeichnet sind. In den Überlebensanalysen war kein Effekt einer verminderten oder gesteigerten B7-H4-Tumorexpression auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

Auch Analysen zur tumoralen MHC1-Expression bestätigen den immunstimulierenden Effekt von Vitamin-D auf die antitumorale Immunantwort, da unter dem VDA-Kollektiv eine signifikante erhöhte MHC1-Expression auf Tumorzellen zu verzeichnen war im Vergleich zu Vitamin-D-Mangel-Patienten

($p = 0,0190$). Dazu kommt, dass Tumorpatienten mit einer gesteigerten tumoralen MHC1-Expression im Vergleich zu solchen mit niedriger MHC1-Tumorexpression ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben aufweisen ($p = 0,0325$). Weiterhin exprimierten Patienten mit einem positiven HPV-Status tumoral signifikant mehr MHC1 als HPV-negative Tumorpatienten ($p = 0,0053$). Dies wäre auch ein möglicher Grund für die besseren prognostischen Aussichten bei HPV-positiven HNSCC-Patienten, da in dieser Patientengruppe insbesondere auch die Anzahl der tumorinfiltrierenden CD8-positiven-zytotoxischen T-Lymphozyten stark erhöht ist und somit durch eine stabilere tumorale MHC1-Präsenz die Erkennung und Eliminierung der Tumorzellen mittels zytotoxischer T-Zellen erleichtert werden könnte. Einige Studien konnten nachweisen, dass in HPV-positiven Tumoren eine aktive über die viralen Proteine E5, E6 und E7 vermittelte Runterregulation der MHC1-Tumorexpression als Immunevasionsstrategie genutzt wird, um die virale Replikation voranzutreiben (Näsman et al. 2013, Campo et al. 2010, Bottley et al. 2007). Da MHC1 im Immunescape eine fundamentale Rolle spielt, kann somit davon ausgegangen werden, dass unter ausreichender Vitamin-D-Versorgung eine tumorinduzierte Reduktion der eigenen MHC1-Oberflächenexpression als Immunevasionsmechanismus eingeschränkt werden könnte und folglich auch die Effektivität einer gezielten Immunantwort durch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten gesteigert werden könnte. Es ergibt sich an dieser Stelle die Frage, durch welchen spezifischen Mechanismus Vitamin-D die tumorale MHC1-Expression zu kontrollieren scheint. Einflüsse von Vitamin-D auf die Mutationshäufigkeit in HLA-Allelen sowie direkten Effekte auf die Antigen-Prozessierungs-Maschinerie wären denkbar (Ferris 2015). Weiterhin könnte eine hohe tumorale MHC1-Expression jedoch indirekt auch für eine geringere NK-Zell-Aktivität gegen den Tumorzellen verantwortlich sein, da hierdurch vermehrt Interaktionen mit inhibitorischen Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche begünstigt werden (Bottley et al. 2007, Murphy & Weaver 2016). Bisher mangelt es an Untersuchungen zur prognostischen Signifikanz des Zusammenhangs zwischen tumoraler MHC1-Expression und NK-Zell-Aktivität bezüglich Kopf-Hals-Tumoren. Um diesen Sachverhalt zu eruieren und die Frage nach einem Effekt von Vitamin-D auf Mutationen in HLA-Allelen sowie molekulare Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie zu klären sind zusätzliche experimentelle und molekulargenetische Untersuchungen der entsprechenden Signalverarbeitungskaskaden notwendig.

Die Betrachtung der tumoralen und leukozytären PD-L1-Expression zeigte ein eher inkonsistentes Bild: Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse ließen keinen kausalen Zusammenhang zwischen der Vitamin-D-Versorgung und der PD-L1-Expression sowohl auf Tumorzellen ($p = 0,4730$) als auch auf intra- ($p = 0,8210$) und peritumoralen Leukozyten ($p = 0,4032$) erkennen. Bei Tumorpatienten mit einer niedrigen tumoralen PD-L1-Expression zeigte sich eine leichte Tendenz zu einem verbesserten Gesamtüberleben ($p = 0,1834$). Die leukozytäre PD-L1-Expression beeinflusste das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten nicht (Daten nicht gezeigt). In der Überlebensanalyse zeigte sich weiterhin, dass Tumorpatienten mit Vitamin-D-Mangel und hoher tumoraler PD-L1-Expression im Vergleich zu solchen mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung und niedriger PD-L1-Tumorexpression ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben aufweisen ($p = 0,0137$). Zudem scheint eine hohe PD-L1-Tumorexpression gerade bei Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung

prognostisch ungünstig zu sein ($p = 0,0613$), während bei HNSCC-Patienten mit Vitamin-D-Mangel, die eine ohnehin schlechte Gesamtprognose haben, kein Überlebensvorteil bei niedriger PD-L1-Expression besteht ($p = 0,5815$). Ersteres lässt sich potenziell dadurch erklären, dass die unter Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung ausgeprägtere Immunaktivität durch die gesteigerte Präsenz von tumoralem PD-L1 stärker supprimiert werden könnte, was wiederum ein Immunescape begünstigen könnte. Zudem wäre denkbar, dass die hohe PD-L1-Expression in dieser Patientengruppe indikativ für ein bereits stattgefundenes Immunescape sein könnte und eventuell nicht durch Vitamin-D beeinflussbare genetische Faktoren für die PD-L1-Überexpression verantwortlich sein könnten, sodass in diesen Fällen der tumorprogressions-hemmende Einfluss von Vitamin-D schwächer wirksam sein könnte. Dimitrov et al. konnten in molekularbiologischen Untersuchungen nachweisen, dass aktives 1,25-OH₂-Vitamin-D über den nukleären Vitamin-D-Rezeptor (VDR) die PD-L1-Expression in humanen Epithelien und myeloischen Zelllinien hochreguliert, was die immunologische Toleranzentwicklung fördert, da hierdurch im physiologischen Zusammenhang eine überschießende (Auto-)Immunreaktion vermieden und das immunologische Mikromilieu kontrolliert wird (Dimitrov et al. 2017). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den in der Literatur charakterisierten immunmodulierenden und stimulierenden Effekten des Vitamin-D. Nachteilig bedeutet eine gesteigerte PD-L1-Tumorexpression im pathophysiologischen Kontext jedoch eine stärkere Suppression bzw. eine verminderte Reaktivität von Lymphozyten im Zuge einer Anti-Tumor-Immunantwort, welches ein Immunescape erleichtert und die Tumorprogression beschleunigen kann. Einen potenziellen Erklärungsansatz für diesen paradoxen Sachverhalt lässt sich bei Betrachtung der Regulation der PD-L1-Expression und im Zusammenhang mit der Immunzellinfiltration sowie dem HPV-Status in HNSCCs finden: Die tumorale PD-L1-Expression wird durch zwei biologisch distinktive Expressionmechanismen gesteuert, die beide zu einer Resistenz des Tumors gegenüber dem endogenen Immunsystem beitragen: Zum einen existiert eine durch tumorintrinsic Faktoren, wie genetische Mutationen oder überstimulierte onkogene Signaltransduktionskaskaden, bedingte konstitutive PD-L1-Expression (Malm et al. 2015, Solomon et al. 2018). In diesem Zusammenhang können weiterhin zahlreiche Kinasen und Enzyme die Immunsuppressivität von PD-L1 durch Regulieren der Aktivität und Stabilität des Moleküls, beispielsweise über Veränderung der Glykosylierungs- oder Ubiquitinierungsmuster vom PD-L1-Protein, beeinflussen (Li et al. 2016, Horita et al. 2017). So kann unter anderem über den PI3K/Akt Signalweg, welcher zudem durch Vitamin-D moduliert werden kann, eine Steigerung der tumoralen PD-L1 Expression hervorgerufen werden (Lyford-Pike et al. 2013). Insbesondere im Zuge der noxeninduzierten Karzinogenese kann davon ausgegangen werden, dass eine pathologisch gesteigerte PD-L1-Expression auf Tumorzellen hauptsächlich über tumorintrinsic Wege vermittelt wird (Ferris et al. 2015, Kowanetz et al. 2018). Dieser Sachverhalt wäre eine Erklärung für die Beobachtung, dass im VDM-Kollektiv ebenfalls zahlreiche hohe IRS-Werte für tumorales PD-L1 ermittelt wurden, da niedrige Vitamin-D-Serumspiegel überwiegend bei Patienten mit noxeninduzierten, mutationslastigen Tumoren sowie immunsuppressiv ausgelegter Tumormikroumgebung zu erwarten sind, während hohe Vitamin-D-Serumkonzentrationen mit verstärkter Immuninfiltration und einer konsekutiv gesteigerten immunologischen Aktivität einhergehen (Bochen et al. 2018). Im Gegensatz dazu kann eine durch

NK-Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten gesteigerte immunologische Aktivität über den inflammatorischen Mediator IFN- γ die PD-L1-Expression auf Tumorzellen induzieren (Kowanetz et al. 2018, Solomon et al. 2018). Eine dynamische PD-L1-Hochregulation über diesen adaptiven Mechanismus kann als Konsequenz der Aktivität antigenspezifischer T-Zellen gegen Tumorzellen angesehen werden und stellt eine initiale protektive Reaktion des Tumors als Ausdruck einer erfolgreichen Tumorzerstörung durch tumorinfiltrierende Lymphozyten dar (Kowanetz et al. 2018, Mandal et al. 2016). Es konnte in einigen Studien eine signifikante Korrelation zwischen der tumoralen PD-L1-Expression, IFN- γ -Spiegel und dem Ausmaß der T-Zell-Infiltration in der Tumormikroumgebung beobachtet werden (Taube et al. 2012, Spranger et al. 2013). Hieraus geht entscheidend hervor, dass immunsuppressive Interaktionen sowohl direkt als auch indirekt vorwiegend durch Immunreaktionen getriggert werden und eben nicht gänzlich von Tumorzellen primär organisiert und kontrolliert werden (Spranger et al. 2013, Solomon et al. 2018): Untersuchungen zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnten nachweisen werden, dass sowohl eine starke tumorale als auch eine ausgeprägte leukozytäre PD-L1-Expression unabhängig voneinander ein verbessertes Therapieansprechen unter einer Behandlung mit dem Anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab bedingen können (Kowanetz et al. 2018). Dies impliziert, dass gerade eine zielgerichtete Blockade des negativen regulatorischen Immun-Checkpoint-Moleküls PD-L1 vorzugsweise für Patienten mit einem vorbestehendem T-Zell-inflammatorischen Tumormikromilieu vorteilhaft sein könnte, welches sich vor allem bei Patienten ausreichender Vitamin-D-Versorgung anbieten könnte (Spranger et al. 2013, Bochen et al. 2018). Im Umkehrschluss wäre denkbar, dass eine Vitamin-D-Substitutionsbehandlung den Erfolg einer therapeutischen PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint-Blockade potenziell steigern könnte, was auf folgender Überlegung beruht: Auch wenn Vitamin-D keine eindeutige Wirkung auf die PD-L1-Expression in Kopf-Hals-Tumoren auszuüben scheint, wäre es sinnvoll gerade Patienten mit Vitamin-D-Mangel und hoher tumoraler PD-L1-Expression früh zu identifizieren um diese einer regelmäßigen Vitamin-D-Behandlung zugänglich zu machen und dadurch die intra- und peritumorale Immunezellinfiltration potentiell steigern zu können, da unter diesen Umständen eine PD-1/PD-L1-Blockade eine gesteigerte Effektivität aufweisen könnte. Unter Berücksichtigung dieser regulatorischen Komplexität von PD-L1 wird schnell klar, dass die immunhistochemische Detektion von PD-L1 in der Tumormikroumgebung eine interpretatorische Herausforderung nach sich zieht, zumal Studien von einer sowohl inter- als auch intratumoralen biologischen Variabilität bzw. Heterogenität von 18%-85% ausgehen (Solomon et al. 2018). Zur umfassenderen Interpretation der PD-L1-Distribution im Tumormikromilieu sollte zusätzlich der HPV-Status herangezogen werden. Hinreichend bekannt ist, dass HPV-positive Kopf-Hals-Tumorpatienten im Schnitt eine bessere Prognose aufweisen als solche mit HPV-negativen HNSCCs (wie auch in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkollektiv gezeigt, $p = 0,0253$). Dies gilt jedoch unabhängig vom Vitamin-D-Serumspiegel, da in HPV-positiven Tumoren sowohl die T-Zell-Infiltration als auch die immunologische Aktivität regulatorischer und zytotoxischer T-Zell-populationen erheblich stärker

ausgeprägt ist als in HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren (Mandal et al. 2016). Zudem kann durch virale Proteine eine stärkere Immunantwort generiert werden. Die durch chronische virale Infektionen der oropharyngealen Schleimhaut als prädisponierende Komponente für die Entwicklung von HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren bedingte lange Antigenexposition kann über das Hochregulieren von Immun-Checkpoint-Molekülen zur einer gesteigerten T-Zell-Erschöpfung („Exhaustion“) führen (Leemans et al. 2018). Kopf-Hals-Tumoren zählen generell zu den Tumorentitäten mit der höchsten Immunzellinfiltration, besonders von CD8-positiven-T-Zellen und NK-Zellen und gleichzeitig auch der höchsten Dichte an immunsuppressiven TREGs (Thorsson et al. 2018). In Untersuchungen von Mandal et al. korrelierte die PD-L1-Expression positiv mit dem Grad der Immunzellinfiltration und dem immunologischen Aktivitätsprofil in HPV-positiven Tumoren. Auch in dieser Hinsicht gilt IFN- γ als Modulator der PD-L1-Expression (Mandal et al. 2016, Spranger et al. 2013), sodass es gerade bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren im Rahmen der Karzinogenese zu einer lokalisiert erhöhten tumoralen und leukozytären PD-L1-Expression kommen kann (Lyford-Pike et al. 2013, Zou 2005). Da HPV-induzierte Kopf-Hals-Tumore eine distinkte Tumorzellbiologie aufweisen kann angenommen werden, dass die tumorintrinsic modulierte konstitutive PD-L1-Expression in diesen Fällen eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Beobachtung zur PD-L1-Tumorexpression in der vorliegenden Arbeit, da eine Tendenz zu einer positiven Korrelation des HPV-Status mit der PD-L1-Tumorexpression nachgewiesen werden konnte ($p = 0,0784$), und weiterhin eine ausreichend hohe Vitamin-D-Versorgung, welche mit einer gesteigerten tumoralen Immuninfiltration einhergeht, oft mit einem HPV-positiven Tumorstatus assoziiert ist (siehe 4.1.1, $p = 0,0189$, Bochen et al. 2018). Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Assoziation zwischen der peri- bzw. intratumoral-leukozytären PD-L1-Expression und dem HPV-Status der Tumorpatienten nachgewiesen werden. Insgesamt kann daher angenommen werden, dass mehrere Möglichkeiten bestehen könnten, wie Vitamin-D potentiell Einfluss auf die Expression von PD-L1 nehmen kann: Denkbar wäre, dass Vitamin-D zum Einen über differenzierungs-fördernde Eigenschaften auf Tumorzellen deren Mutationslast sowie tumorintrinsic Malignitäts-entwicklungsprozesse limitieren und somit zu einer geringeren konstitutiven PD-L1 Expression führen könnte. Zum Anderen könnte durch die verstärkte Immunaktivität unter Einfluss von Vitamin-D die adaptive tumorale PD-L1-Expression, getriggert über IFN- γ , gesteigert werden. Zusätzlich sollte der HPV-Status des HNSCC-Patienten in Bezug auf die Interpretation der PD-L1-Expression im Tumor berücksichtigt werden. Dazu kommt, dass immunhistochemische Färbungen von Biopsien oder Tumorproben prinzipiell eine Art „Momentaufnahme“ des Tumormikromilieus in räumlicher und zeitlicher Abhängigkeit darstellen, woraus meist nicht eindeutig hervorgeht in welchem Verhältnis die gezeigten Veränderungen zur biologischen Tumorprogression stehen: Eine gesteigerte tumorale PD-L1-Expression kann entweder als Ausdruck einer adaptiven tumoralen Reaktion auf die antitumorale Aktivität tumorinfiltrierender Immunzellen oder als Malignitätskorrelat der tumorintrinsic initiierten Immunresistenz gedeutet werden. Im ersten Falle fungiert PD-L1 als dynamischer Biomarker, als Korrelat einer

inflammatorischen Tumormikroumgebung, während in letzterem Falle PD-L1 als ubiquitärer anti-apoptotischer Zielrezeptor der Tumorzelle, indikativ für eine maligne Transformation und biologische Dysregulation der Epithelzelle, angesehen werden könnte. Jedoch könnte auch eine im Rahmen einer verstärkten Immunaktivität adaptiv gesteigerte PD-L1 Distribution über Zeit in ein immunsuppressives Tumormikromilieu zweckentfremdet werden. Aus diesem Grunde bedarf es womöglich molekular-genetischer Untersuchungen oder der Bestimmung des IFN- γ -Spiegels im Tumormikromilieu der entsprechenden Malignome, um klare Aussagen über die konkrete Bedeutung der immunhisto-chemischen PD-L1-Expression im individualisierten Patientenfall treffen zu können. Insgesamt konnte im vorliegenden Patientenkollektiv bei HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung in Relation zu Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von 10 Monaten nachgewiesen werden ($p = 0,0288$), was zum einen durch die signifikant gesteigerte Leukozyteninfiltration in dieser Patientengruppe (Bochen et al. 2018) und zum anderen ebenso durch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte des Vitamin-D auf die Immun-Checkpoint-Molekül-Expression bedingt sein kann. Die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 55% in HNSCCs könnte unter Berücksichtigung dieser Überlebensdaten durch eine ausreichend hohe Vitamin-D-Versorgung verbessert werden. Dieser prognostisch positive Effekt durch Vitamin-D scheint interessanterweise in HPV-positiven Tumoren deutlich geringer ausgeprägt zu sein als bei HPV-negativen HNSCC-Fällen: Unter HPV-negativen Tumorpatienten geht ein ausreichender Vitamin-D-Spiegel mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit Vitamin-D-Mangel einher ($p = 0,0325$), während bei HPV-positivem Tumorstatus kein klarer Überlebensvorteil in Assoziation mit dem Vitamin-D-Status beobachtet werden kann ($p = 0,4060$, Bochen et al. 2018). Dies kann womöglich durch die charakteristische Tumormolekularbiologie in HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren bedingt sein, wo zum Einen bereits eine verhältnismäßig hohe und prognostisch lenkende immunologische Aktivität im Tumormikromilieu vorliegt, sodass das immunstimulierende Potential von Vitamin-D einen geringeren Effekt zeigen könnte. Zum anderen resultiert aus einer von Natur aus geringeren Mutationslast im Vergleich zu HPV-negativen HNSCCs eine grundsätzlich gesteigerte Sensitivität HPV-positiver Tumoren gegenüber einer Chemo- bzw. Bestrahlungstherapie (Fakhry et al. 2008, Ihloff et al. 2010). Dazu kommt, dass die durch eine Radio- bzw. Chemotherapie lokal erzeugten inflammatorischen und zytotoxischen Prozesse eine effektivere Immunantwort gegen HPV-spezifische Antigene induzieren können, indem immunologische Interaktionen zwischen Effektorzellen und Tumorzellen verstärkt werden: Durch die Therapie absterbende Tumorzellen sezernieren vermehrt sogenannte „danger-associated molecular pattern“ Moleküle (DAMPs), wie beispielsweise HMGB1, welches antigenpräsentierende Zellen rekrutieren kann sowie über TLR4 deren Differenzierung anregt, sodass die ebenfalls im Zuge der Tumorthherapie vermehrt freigesetzten HPV-assoziierten Antigene effizienter an T-Effektorzellen präsentiert werden können (Andersen et al. 2014).

Schließlich bedarf es einer umfassenden multivarianten Datenanalyse mit einem größeren und besser bezüglich Tumorsubtypen und Patienteneigenschaften abgestimmten Patientenkollektiv um klären zu können, ob Vitamin-D prognostisch als unabhängiger Faktor im Zusammenhang mit weiteren immunmodulatorischen Aspekten gelten kann. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasste zeitlich über etwa eineinhalb Jahre hinweg registrierte HNSCC-Fälle im Saarland und angrenzender Regionen, wobei das Kollektiv in dieser Hinsicht zu klein ($n = 112$) und in Bezug auf Patientencharakteristika und Tumorlokalisation zu heterogen war.

5.3 Versuche zur Bestimmung der Immunrezeptorexpression in der FaDu-Zelllinie

Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Analysen war es, die Expression der Immunrezeptoren CD80, MHC1, PD-L1, B7-H3 und B7-H4 in der FaDu-Zelllinie zu untersuchen um diese in dann nachfolgenden Versuchen mit der Proteinexpression von FaDu-Zellen, die mit Vitamin-D behandelt wurden, zu vergleichen. So sollte *in vitro* nachvollzogen werden können, ob eine Behandlung mit Vitamin-D tatsächlich aktiv Einfluss auf die Immunrezeptorexpression in Kopf-Hals-Tumorzellen nehmen kann. Oberflächlich verankerte Proteinkomplexe können durch proteolytische Aktivität enzymatischer Maßnahmen zur Zelldissoziation qualitativ und quantitativ geschädigt sowie in ihrer Konformation verändert werden, sodass modifizierte Epitope oder ein gestörtes Zellwachstumsverhalten entstehen kann (Huang et al. 2010, Tsuji et al. 2017). Von dieser Problematik ausgehend wurde die standardmäßige Verwendung der Serinprotease Trypsin zum Lösen adhärenter Zellen von der Wachstumsfläche nochmals kritisch hinsichtlich der modifikativen bzw. destruktiven Potenz bezüglich der zu detektierenden Epitope betrachtet, da entsprechende Western Blots von trypsinierten FaDu-Wildtyp-Zellen bis auf die Ladekontrolle β -Aktin sowie dem Immun-Checkpoint PD-L1, wider Erwarten keine signalstarken Banden im zu erwartenden Bereich der weiteren zu detektierenden Immunrezeptoren zeigten. Aus diesem Grunde erfolgte eine Umstellung auf andere Verfahren zur Zelldissoziation um zu untersuchen, ob das Zellernteprozedere ursächlich für den fehlenden Proteinnachweis sein könnte. Zu den verwendeten Alternativen zum herkömmlichen Trypsin zählen neben Papain das rekombinant hergestellte TrypLE™ Select und Accutase®, eine Enzymmischung mit sowohl proteolytischer als auch kollagenolytischer Aktivität. Letztere Substanzen beeinträchtigen bei vergleichbarer Nutzungsdauer und Konzentration die Zellregeneration und Viabilität deutlich geringer als Trypsin und wirken dabei schonender auf exprimierte Membranproteine (Tsuji et al. 2017). Bei experimentellen Untersuchungen an Kardiomyozyten erwies sich Papain als noch effektiveres Zelldissoziationsmittel bezüglich Zellviabilität und funktioneller Integrität im Vergleich zu TrypLE™ Select und Accutase® (Fischer et al. 2018). Interessanterweise zeigte sich im Western Blot kein klarer Unterschied in der Signalstärke sowie dem Laufverhalten der Ladekontrolle β -Aktin zwischen den verschiedenen Dissoziationsmethoden, was die Frage aufwarf, ob die FaDu-Zelllinie diese oberflächen Moleküle tatsächlich *in vitro* nicht exprimiert oder ob methodologisch-praktische Fehler im Versuchsprotokoll ursächlich für eine unzuverlässige Membranproteindetektion sein könnten. Zudem wurden die genutzten Primärantikörper ebenfalls für

die immunhistochemischen Experimente dieser Arbeit in zum Teil deutlich stärkeren Konzentrationen verwendet. Um diese Fragen weiter zu klären wurden zusätzlich Zellproben der Zervixkarzinomzelllinie HeLa sowie der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7, zu denen wissenschaftliche Publikationen zur vorhandenen Expression von einigen der in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine vorlagen (Wang et al. 2015, Grenga et al. 2014), als Positivkontrollen herangezogen und dann im Anschluss mittels Western Blot untersucht. Weiterhin wurde die im SDS-Gel aufgetragene Zellmenge um 25% erhöht. Hierbei konnte bei allen Zelllinien und Proben beobachtet werden, dass keine nachweisbare Proteinexpression von MHC1, B7-H4, B7-H3, und CD80 vorlag. Lediglich für PD-L1 konnte ein schwaches Signal in Form von 3 Banden unterschiedlicher Laufhöhe detektiert werden. Letztere Beobachtung liegt vermutlich darin begründet, dass unterschiedliche Formen von N-glykosyliertem PD-L1 in den Zelllinien vom Antikörper detektiert wurden, da zum einen beim unglykolisierten PD-L1-Molekül ein Molekulargewicht von etwa 33 kDa zu erwarten wäre und zum anderen PD-L1 an mehreren Stellen bevorzugt N-Glykosylierungen aufweisen kann (N35, N192, N200 und N219; Li et al. 2016). Die N-Glykosylierung wie auch das Ubiquitinierungsmuster scheinen weiterhin von funktioneller Relevanz zu sein, da diese die Molekülstabilität und somit auch die immunsuppressive Potenz von PD-L1 gewährleisten und potenzieren (Li et al. 2016, Horita et al. 2017).

Es erscheint plausibel, dass Komponenten der in dieser Arbeit angewandten proteinbiochemischen Methoden die zu untersuchenden Oberflächenproteine in einem nicht quantifizierbaren Maße degradieren bzw. modifizieren und somit eine Detektion dieser Proteine nicht gelingen könnte: Denaturierende Agenzien im Rahmen der Probenvorbereitung sowie eine Modifizierung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine durch SDS im Zuge der Gelelektrophorese könnten zur fehlenden Nachweisbarkeit der Immunrezeptoren geführt haben. Da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper als Epitop ein charakteristisches humanbiologisches Kernelement des nachzuweisenden Moleküls detektieren sollten, wäre der Nachweis eines stärkeren Signals durch Antikörper mit anderer Epitopspezifität eher unwahrscheinlich aber ebenfalls eine zu berücksichtigende Option zur weiteren Versuchsplanung. Entsprechende Versuche sind derzeit in Planung. Nach diesen Ergebnissen stellt sich nun die zentrale Frage mit welcher molekularbiologischen Methodik eine zuverlässige Beurteilung der Immunrezeptorexpression auf FaDu-Zellen ermöglicht werden könnte. Zukünftige realisierbare Experimentansätze könnten immunzytochemische oder durchflusszytometrische Analysen einschließen, bei denen die Expression der in dieser Arbeit betrachteten Immunrezeptoren sowohl auf FaDu-Wildtyp-Zellen als auch auf anderen HNSCC-Zelllinien quantifiziert werden könnte: So ermittelten Kulasinghe et al. über ein Immunassay basierend auf einem immunzytochemischen Verfahren die PD-L1-Expression in verschiedenen HNSCC-Zelllinien (FaDu, SCC25, CAL27, SCC15, 93-Vu-147 T; Kulasinghe et al. 2017). Grenga et al. bestimmten die PD-L1- und MHC1-Expression in 19 humanen Karzinomzelllinien mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR (Grenga et al. 2014). Als Kerngedanke dieser Arbeit gilt die Untersuchung eines potentiellen Effekts von Vitamin-D auf die Expression der Immunrezeptoren CD80, MHC1, PD-L1, B7-H3 und B7-H4 auf HNSCC-Zellen. Um eine direkte Aussage über den Einfluss von Vitamin-D auf die Immunrezeptorexpression *in vitro* treffen zu können, wäre auch folgender immunzytochemischer Ansatz denkbar: Kultivierte HNSCC-Zellen (beispielsweise FaDu-Zellen) könnten mit unterschiedlichen Konzentrationen an 1,25-

OH₂-Vitamin-D₃ behandelt werden und zu fest definierten Zeitpunkten entnommene Zellproben könnten schließlich für eine immunzytochemische Färbung genutzt werden, bei der eine Beurteilung der Proteinexpression der Immunrezeptoren erfolgen könnte. Zudem könnte die mRNA-Expression der Immun-Checkpoint-Moleküle über eine qPCR ermittelt werden oder eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der Tumorzelllinien erfolgen. Wichtig wäre außerdem die Eingliederung einer HPV-positiven HNSCC-Zelllinie in diese Versuchsreihe, da aus Überlebensanalysen dieser Arbeit und der Publikation von Bochen et al. hervorgeht, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung für HPV-positive HNSCC-Patienten keine prognostische Relevanz zu haben scheint (Bochen et al. 2018). Aus zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen zur *in vitro*-Nutzung von Vitamin-D zur Analyse des Differenzierungs- und Proliferationsverhaltens von verschiedensten Tumor- bzw. tumorassozierten Zelllinien geht hervor, dass experimentell verwendete 1,25-OH₂-Vitamin-D₃-Konzentrationen im supraphysiologischen Bereich lagen und oberhalb von 10⁻⁸ M ein proliferationshemmender Effekt nachgewiesen werden konnte (Yang et al. 2016, Chiang et al. 2013, Kornfehl et al. 1996). Da die proliferationshemmenden Effekte auf die Tumorzellen und die damit assoziierten Differenzierungsvorgänge nicht vordergründig untersucht werden sollten, sondern vielmehr die Untersuchung der Wirkung von aktivem Vitamin-D auf die Expression der Immun-Checkpoint-Moleküle unter physiologisch realisierbaren Bedingungen als Ziel der Versuchsreihe gilt, sollten auch physiologische Konzentrationen an 1,25-OH₂-Vitamin-D₃ für die Zellkulturversuche in Betracht gezogen werden. Diese sollten sich im Bereich der physiologischen 1,25-OH₂-Vitamin-D₃-Serumspiegel (etwa 30 ng/ml bis 60 ng/ml), also im Pikomolarbereich, orientieren. Auch der bereits geschilderte Aspekt der posttranslationalen Modifikationen am PD-L1-Molekül durch N-Glykosylierungen, welche in dieser Arbeit im Western Blot höchstwahrscheinlich erfasst wurden, eröffnen interessante Perspektiven zur weiteren experimentellen Planung: Es stellt sich die Frage, ob Vitamin-D das Glykosylierungsmuster von PD-L1 beeinflussen könnte, und somit indirekt Auswirkungen auf die immunsuppressive Potenz des PD-L1 sowie die Stabilität einer PD-1/PD-L1-Interaktion haben könnte. Letzterer Aspekt könnte insbesondere für immuntherapeutische Konzepte von Bedeutung sein.

5.4 Ausblick und Fazit

Zusammenfassend verdeutlichen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten neben dem prognostischen günstigen Einfluss einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung für HNSCC-Patienten weiterhin den modulierenden Effekt von Vitamin-D und HPV auf die Signaltransduktion zwischen Immunzelle und Tumorgewebe durch Immun-Checkpoint-Moleküle. Vitamin-D fördert die Anti-Tumor Aktivität des körpereigenen Immunsystems auf molekularbiologischer Ebene durch Modifikation des Verhältnisses von immunstimulierenden zu immunhemmenden Immun-Checkpoint-Interaktionen. Einen ähnlichen Effekt auf die Immun-Checkpoint-Molekül-Expression konnte in HPV-positiven Tumoren beobachtet werden. Dadurch wird ein Entkommen aus der immunologischen Kontrolle erschwert und die Tumorprogression potenziell verzögert. Diesbezüglich ist es wichtig zu beachten, dass neben dem durch Vitamin-D beeinflussten tumoralen und leukozytären

Expressionsprofil der untersuchten Immun-Checkpoint-Moleküle weitere Zytokine und zelluläre Mediatoren in der Tumormikroumgebung, welche ebenfalls im immunologischen Crosstalk zwischen Tumor- und Immunzelle involviert sind, an Immunevasionsprozessen beteiligt sein könnten. In dieser Hinsicht wäre es interessant zu untersuchen, in welchem Ausmaß Vitamin-D modifizierend auf das peritumorale Zytokinprofil Einfluss nehmen könnte und damit einhergehende potentielle Veränderungen mit der Immun-Checkpoint-Expression im Tumorgewebe zu vergleichen. Gerade der Einfluss von Vitamin-D auf die tumorale Expression der Immun-Checkpoint-Moleküle B7-H4, B7-H3 und CD80, welche ihre Wirkung über mehrere verschiedene und teilweise noch nicht gänzlich charakterisierte Zielrezeptoren entfalten, könnte wahrscheinlich insbesondere dann besser interpretiert werden, wenn weitere durch Vitamin-D induzierte Veränderungen in der zellulären und humoralen Komposition der Tumormikroumgebung identifiziert werden würden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern potentielle Anhaltspunkte für diese Argumentation, sodass neben einer fokussierten Betrachtung der immunologischen Organisation in HNSCCs funktionell-immunologische Veränderungen im Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Status weiter untersucht werden sollten und zusätzlich experimentelle Ansätze an HNSCC-Zellproben für diese Fragestellungen berücksichtigt werden sollten. Aktuell sind *in vitro*-Experimente an HNSCC-Zelllinien, die mit aktivem Vitamin-D in sowohl supraphysiologischen als auch physiologischen Konzentrationen behandelt werden in Planung.

Hinreichend bekannt ist, dass HNSCCs durch eine starke immuninfiltrierende Komponente gekennzeichnet sind, deren Ausmaß zudem vom HPV-Tumorstatus beeinflusst wird. Das immunsuppressive Tumormikromilieu in Kopf-Hals-Tumoren wird insbesondere durch die Präsenz regulatorischer T-Zellen aufrechterhalten und moduliert (Ferris 2015, Mandal et al. 2016). Einerseits sind TREGs dazu befähigt inflammatorische Prozesse in der Tumormikroumgebung, welche gerade bei Kopf-Hals-Tumoren einen hohen Stellenwert bezüglich einer effektiven Tumorprogression einnehmen, einzudämmen. Andererseits agieren TREGs immunsuppressiv auf diverse T-Effektorzellen, was konsekutiv die Tumorprogression erleichtern und die Tumorbekämpfung erschweren kann. Diese zellulär inhibierenden Eigenschaften von TREGs werden insbesondere über CTLA-4 vermittelt (Chen et al. 2017). In dieser Hinsicht wäre es interessant zu erforschen, inwiefern Vitamin-D die Tumor infiltrierenden Effektorzellen sowie die TREGs in ihrer Aktivität und Funktionalität beeinflussen kann. Hierzu werden aktuell in der HNO-onkologischen Forschungsgruppe an der Universitätsklinik des Saarlandes unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. M. Linxweiler und F. Bochen, M.Sc., experimentelle Untersuchungen zur lytischen Signatur von durch Vitamin-D aktivierten immunologischen Zielzellen, wie NK-Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten, durchgeführt.

Abschließend kann, unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erhobenen Daten und allen bisher aufgeführten Aspekten, zusammenfassend festgestellt werden, dass durch eine ausreichend hohe Vitamin-D-Versorgung ein klarer Überlebensvorteil bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumorerkrankungen im Vergleich zu HNSCC-Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel erreicht werden kann sowie dass Vitamin-D und HPV regulativ in die Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen in der Tumormikroumgebung von HNSCCs eingreifen können. Die überwiegend immunsuppressiven Signalwege in der Tumormikroumgebung können durch einen ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel

Diskussion

und einen positiven HPV-Tumorstatus verhältnismäßig eingeschränkt werden, sodass eine effektivere Anti-Tumor-Immunantwort generiert werden kann und tumorprogressions-fördernde Eigenschaften reduziert werden können. Damit demonstrieren diese Ergebnisse, dass es für HNSCC-Tumorpatienten vorteilhaft und von enormer Bedeutung sein kann, auf eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung zu achten und die behandelnden Ärzte diesbezüglich zu sensibilisieren. Insbesondere im Hinblick auf immuntherapeutische und chemotherapeutische Ansätze erfordert die aktuelle Medizin zusätzliche experimentelle Untersuchungen und Studien zur immunmodulativen Potenz des Vitamin-D im Rahmen von Tumorerkrankungen um zu differenzieren und zu eruieren, inwieweit eine Vitamin-D-Substitution im Zusammenhang mit personalisierten Immuntherapien in der Kopf-Hals-Onkologie effektiv eingesetzt werden kann um letztlich eine verbesserte Prognose und Lebensqualität der Patienten zu erreichen.

6. Literaturverzeichnis

1. Afzal, S., Bojesen, S.E. & Nordestgaard, B.G., 2013. Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clinical chemistry*, 59(5), pp.771–780.
2. Andersen, A.S. et al., 2014. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 134(12), pp.2755–2763.
3. Ang, K.K. et al., 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1), pp.24–35.
4. Apperly, F.L., 1941. The Relation of Solar Radiation to Cancer Mortality in North America. *Cancer research*, 1(3), pp.191–195.
5. Arem, H. et al., 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in Finnish men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(6), pp.1178–1184.
6. Autier, P. & Gandini, S., 2007. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*, 167(16), pp.1730–1737.
7. Badoual, C. et al., 2013. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer research*, 73(1), pp.128–138.
8. Baeke, F. et al., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology*, 10(4), pp.482–496.
9. Baeke, F., Takiishi, T., et al., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), pp.482–469
10. Bauernhofer, T. et al., 2003. Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *European journal of immunology*, 33(1), pp.119–124.
11. Ben-Shoshan, M. et al., 2007. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 6(4), pp.1433–1439.
12. Bischoff-Ferrari, H.A. et al., 2006. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), pp.18–28.
13. Bittenbring, J.T. et al., 2014. Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(29), pp.3242–3248.
14. Bochen, F. et al., 2018. Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function. *Oncoimmunology*, 1(9), pp.1–10.

15. Boonstra, A. et al., 2001. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*, 167(9), pp. 4974–4980.
16. Bottley, G. et al., 2007. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene*, 27(12), pp.1794–1799.
17. Bouillon, R. et al., 2008. Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), pp.726–776.
18. Bray, F. et al., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp. 394–424.
19. Broe, K.E. et al., 2007. A Higher Dose of Vitamin D Reduces the Risk of Falls in Nursing Home Residents: A Randomized, Multiple-Dose Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(2), pp.234–239.
20. Campo, M.S. et al., 2010. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, 407(1), pp.137–142.
21. Carlberg, C., 2014. The physiology of vitamin D-far more than calcium and bone. *Frontiers in physiology*, 5(248), p.335.
22. Chang, C.-S. et al., 2007. Expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules are potential markers for better survival in nasopharyngeal carcinoma. *BMC cancer*, 7, p.88.
23. Chen, L., 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews. Immunology*, 4(5), pp.336–347.
24. Chen, L. & Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology*, 13(4), pp.227–242.
25. Chen, D.S. & Mellman, I., 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), pp.1–10.
26. Chen, X. et al., 2017. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4. *Pathology, research and practice*, 213(3), pp.245–249.
27. Chiang, K.-C. et al., 2013. MART-10, a novel vitamin D analog, inhibits head and neck squamous carcinoma cells growth through cell cycle arrest at G₀/G₁ with upregulation of p21 and p27 and downregulation of telomerase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138, pp. 427–434.
28. Christakos, S. et al., 2016. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*, 96(1), pp.365–408.
29. Concha-Benavente, F. et al., 2016. Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. *Oral oncology*, 58, pp. 52–58.
30. Dankers, W. et al., 2016. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Frontiers in immunology*, 7, p.697.

31. Dasgupta, S. et al., 2005. Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *The Journal of Immunology*, 175(8), pp.5541– 5550.
32. Davis, R.J., Ferris, R.L. & Schmitt, N.C., 2016. Costimulatory and coinhibitory immune checkpoint receptors in head and neck cancer: unleashing immune responses through therapeutic combinations. *Cancers of the Head & Neck*, 1(1), p.E359.
33. Dawson-Hughes, B. et al., 2005. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 16(7), pp.713–716.
34. Dimitrov, V. et al., 2017. Hormonal vitamin D up-regulates tissue-specific PD-L1 and PD-L2 surface glycoprotein expression in humans but not mice. *The Journal of biological chemistry*, 292(50), pp. 20657–20668.
35. Dörr, J. et al., 2012. Efficacy of Vitamin D Supplementation in Multiple Sclerosis (EVIDIMS Trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 13(1), p.1502.
36. Dusso, A.S., Brown, A.J. & Slatopolsky, E., 2005. Vitamin D. *American journal of physiology. Renal physiology*, 289(1), pp.F8–28.
37. D'Souza, G. et al., 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(19), pp.1944–1956.
38. Economopoulou, P., Kotsantis, I. & Psyrri, A., 2016. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: combinatorial immunotherapy approaches. *ESMO Open*, 1(6), p.e000122.
39. Fakhry, C. et al., 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), pp.261–269.
40. Fanidi, A. et al., 2016. Circulating vitamin D in relation to cancer incidence and survival of the head and neck and oesophagus in the EPIC cohort. *Scientific reports*, 6(1), p.36017.
41. Ferris, R.L., 2015. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(29), pp. 3293–3304.
42. Ferris, R.L. et al., 2016. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375(19), pp.1856–1867.
43. Feskanich, D. et al., 2004. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(9), pp.1502–1508.
44. Fischer, B. et al., 2018. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC- derived cardiospheres. *Stem cell research*, 32, pp.65–72.
45. Garland, C.F. et al., 2006. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health*, 96(2), pp.252–261.
46. Gedlicka, C. et al., 2006. 1,25(OH)₂Vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. *Journal of oral*

- pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, 35(8), pp.472–478.
47. Giovannucci, E. et al., 2006. Prospective Study of Predictors of Vitamin D Status and Cancer Incidence and Mortality in Men. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 98(7), pp.451–459.
 48. Goy, J. et al., 2009. Diagnostic delay and disease stage in head and neck cancer: a systematic review. *The Laryngoscope*, 119(5), pp.889–898.
 49. Grant, W.B., 2016. Roles of Solar UVB and Vitamin D in Reducing Cancer Risk and Increasing Survival. *Anticancer research*, 36(3), pp.1357–1370.
 50. Grenga, I. et al., 2014. PD-L1 and MHC-I expression in 19 human tumor cell lines and modulation by interferon-gamma treatment. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(S3), p.P102.
 51. Gugatschka, M. et al., 2011. Vitamin D status is associated with disease-free survival and overall survival time in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268(8), pp.1201–1204.
 52. Hager, G. et al., 2001. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Oto-Laryngologica*, 121(1), pp.103–109.
 53. Hashibe, M. et al., 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 18(2), pp.541–550.
 54. Hashim, D. et al., 2016. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(8), pp.1619–1625.
 55. Hershberger, P.A. et al., 2002. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Molecular cancer therapeutics*, 1(10), pp.821–829.
 56. Holick, M.F., 2007. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), pp.266–281.
 57. Holick, M.F., 2009. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology*, 19(2), pp.73–78.
 58. Holick, M.F., 2017. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 18(2), pp.153–165.
 59. Horita, H. et al., 2017. Identifying Regulatory Posttranslational Modifications of PD-L1: A Focus on Monoubiquitination. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(4), pp.346–353.
 60. Huang, H.-L. et al., 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of biomedical science*, 17(1), p.36.
 61. Ihloff, A.S. et al., 2010. Human papilloma virus in locally advanced stage III/IV squamous cell cancer of the oropharynx and impact on choice of therapy. *Oral oncology*, 46(10), pp.705–711.

62. Katayama, A. et al., 2011. Expression of B7-H3 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis. *International journal of oncology*, 38(5), pp.1219–1226.
63. Klussmann, J.P. et al., 2003. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *The American journal of pathology*, 162(3), pp.747–753.
64. Kongsbak, M. et al., 2014. Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4+ T Cells M. Bradl, ed. *PLoS ONE*, 9(5), pp.e96695–12.
65. Kornfehl, J. et al., 1996. Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D3 (1,25 [OH]₂ D3) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 253(6), pp.341–344.
66. Kowanetz, M. et al., 2018. Differential regulation of PD-L1 expression by immune and tumor cells in NSCLC and the response to treatment with atezolizumab (anti-PD-L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), pp.E10119–E10126.
67. Kryczek, I. et al., 2006. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 177(1), pp.40–44.
68. Kulasinghe, A. et al., 2017. PD-L1 expressing circulating tumour cells in head and neck cancers. *BMC cancer*, 17(1), p.333.
69. Kuss, I. et al., 2004. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(11), pp.3755–3762.
70. Laban, S. et al., 2015. [Immunotherapy of head and neck tumors: Highlights of the ASCO Meeting 2015]. In *HNO*. pp. 612–619.
71. Lang, S. et al., 1999. Impairment of T-cell activation in head and neck cancer in situ and in vitro: strategies for an immune restoration. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 125(1), pp. 82–88.
72. Lechner, A. et al., 2017. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(27), pp.44418–44433.
73. Leemans, C.R., Braakhuis, B.J.M. & Brakenhoff, R.H., 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(1), pp.9–22.
74. Leemans, C.R., Snijders, P.J.F. & Brakenhoff, R.H., 2018. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(5), pp.269–282.
75. Lewis, A. et al., 2015. The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(9), pp.616–626.
76. Lindquist, D. et al., 2007. Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Molecular oncology*, 1(3), pp.350–355.

77. Li, C.-W. et al., 2016. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nature communications*, 7, p.12632.
78. Linxweiler, M. et al., 2015. Combination of p16(INK4a) /Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer cytopathology*, 123(4), pp.219–229.
79. Loo, D. et al., 2012. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(14), pp.3834–3845.
80. López-Albaitero, A. et al., 2006. Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL. *The Journal of Immunology*, 176(6), pp.3402–3409.
81. Lyford-Pike, S. et al., 2013. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 73(6), pp.1733–1741.
82. Ma, Y. et al., 2008. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model. *Molecular cancer therapeutics*, 7(9), pp. 3047–3055.
83. Ma, Y., Johnson, C.S. & Trump, D.L., 2016. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. *Vitamins & Hormones*, 100, pp.395–431.
84. MacGregor, H.L. & Ohashi, P.S., 2017. Molecular Pathways: Evaluating the Potential for B7-H4 as an Immunoregulatory Target. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(12), pp.2934–2941.
85. Malm, I.-J. et al., 2015. Expression profile and in vitro blockade of programmed death-1 in human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 37(8), pp.1088–1095.
86. Mandal, R. et al., 2016. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI insight*, 1(17), p.e89829.
87. Manson, J.E. et al., 2018. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, p.NEJMoa1809944.
88. Mao, L. et al., 2017. Selective blockade of B7-H3 enhances antitumour immune activity by reducing immature myeloid cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(9), pp.2199–2210.
89. Marur, S. et al., 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*, 11(8), pp.781–789.
90. Marur, S. & Forastiere, A.A., 2016. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic proceedings*, 91(3), pp.386–396.
91. Maxwell, J.H., Grandis, J.R. & Ferris, R.L., 2016. HPV-Associated Head and Neck Cancer: Unique Features of Epidemiology and Clinical Management. *Annual review of medicine*, 67(1), pp.91–101.

92. Mehra, R. et al., 2018. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *British journal of cancer*, 119(2), pp.153–159.
93. Meier, J.D. et al., 2007. Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 133(11), pp.1149–1152.
94. Meurman, J.H., 2010. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral oncology*, 46(6), pp.411–413.
95. Meyer, F. et al., 2011. Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *International Journal of Cancer*, 128(7), pp.1741–1746.
96. Mittal, D. et al., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases —elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, pp.16–25.
97. Moretta, L. et al., 2002. Human NK cells and their receptors. *Microbes and infection*, 4(15), pp.1539–1544.
98. Moukayed, M. & Grant, W.B., 2017. The roles of UVB and vitamin D in reducing risk of cancer incidence and mortality: A review of the epidemiology, clinical trials, and mechanisms. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 18(2), pp.167–182.
99. Münscher, A. et al., 2014. Role of panendoscopy in identifying and managing risk of head and neck squamous cell carcinoma in routine follow-up: a retrospective clinical evaluation. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(7), pp.1769–1775.
100. Murphy K.M. & Weaver C., 2016. *Janeway's Immunobiology*, ROUTLEDGE
101. Näsman, A. et al., 2013. MHC class I expression in HPV positive and negative tonsillar squamous cell carcinoma in correlation to clinical outcome. *International Journal of Cancer*, 132(1), pp.72–81.
102. Norman, A.W. et al., 2007. 13th Workshop consensus for vitamin D nutritional guidelines. In *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. pp. 204–205.
103. Orell-Kotikangas, H. et al., 2012. High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis. *Head & neck*, 34(10), pp.1450–1455.
104. Partlová, S. et al., 2015. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*, 4(1), p.e965570.
105. Paul, S. & Lal, G., 2017. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 8, p.347.
106. Peller, S. & Stephenson, C.S., 1937. SKIN IRRITATION AND CANCER IN THE U. S. NAVY. *The American Journal of the Medical Sciences*, 194(3), pp.326–333.
107. Pletinckx, K. et al., 2011. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Frontiers in immunology*, 2, p.39.
108. Prietl, B. et al., 2013. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients*, 5(7), pp.2502–2521.

109. Psyrrri, A., Rampias, T. & Vermorken, J.B., 2014. The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(11), pp.2101–2115.
110. Qi, X. et al., 2017. Advances in T-cell checkpoint immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 10, pp.5745–5754.
111. Ramos, M., Benavente, S. & Giralt, J., 2010. Management of squamous cell carcinoma of the head and neck: updated European treatment recommendations. *Expert review of anticancer therapy*, 10(3), pp.339–344.
112. Rapidis, A.D. & Wolf, G.T., 2009. Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *Journal of oncology*, 2009(3), pp.346345–11.
113. Remmele, W., Stegner, H.E., 1987. A proposal for the standardization of the immunoreactive score (Irs) for the immunohistochemical demonstration of estrogen-receptors (Er-Ica) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8, 138-140
114. Rodriguez-Bruno, K., Ali, M.J. & Wang, S.J., 2011. Role of panendoscopy to identify synchronous second primary malignancies in patients with oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 33(7), pp.949–953.
115. Ross, A.C. et al., 2011. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(1), pp.53–58.
116. Seiwert, T.Y. et al., 2015. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV- negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(3), pp.632–641.
117. Sempos, C.T. et al., 2012. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 243, pp.32–40.
118. Sempos, C.T. et al., 2018. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. *British journal of clinical pharmacology*, 84(10), pp.2194–2207.
119. Singhi, A.D. & Westra, W.H., 2010. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*, 116(9), pp.2166–2173.
120. Solomon, B., Young, R.J. & Rischin, D., 2018. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Seminars in cancer biology*, 52(Pt 2), pp.228–240.
121. Song, M. et al., 2016. Plasma 25-hydroxyvitamin D and colorectal cancer risk according to tumour immunity status. *Gut*, 65(2), pp.296–304.

122. Spranger, S. et al., 2013. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Science translational medicine*, 5(200), p. 200ra116.
123. Steinman, R.M. & Young, J.W., 1991. Signals arising from antigen-presenting cells. *Current Opinion in Immunology*, 3(3), pp.361–372.
124. Taube, J.M. et al., 2012. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine*, 4(127), p.127ra37.
125. Thomas, G.R. & Wen, J., 2006. Endogenous expression of CD80 co-stimulatory molecule facilitates in vivo tumor regression of oral squamous carcinoma. *Anticancer research*, 26(6B), pp.4093–4101.
126. Thorsson, V. et al., 2018. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 48(4), pp.812–830.e14.
127. Tirapu, I. et al., 2006. Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma. *Cancer research*, 66(4), pp.2442–2450.
128. Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M., 2015. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, 27(4), pp.450–461.
129. Tsuji, K. et al., 2017. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell transplantation*, 26(6), pp.1089–1102.
130. van Schoor, N.M. & Lips, P., 2011. Worldwide vitamin D status. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 25(4), pp.671–680.
131. Vaughan-Shaw, P.G. et al., 2017. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 116(8), pp.1092–1110.
132. Vokes, E.E. et al., 1993. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 328(3), pp.184–194.
133. Vuolo, L. et al., 2012. Vitamin D and cancer. *Frontiers in endocrinology*, 3, p.58.
134. Walker, D.D. et al., 2012. Immunological modulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine*, 58(3), pp.448–454.
135. Walsh, J.E. et al., 2010. Use of alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma. *Human immunology*, 71(7), pp.659–665.
136. Wang, Z. et al., 2015. Differential expression of 2IgB7-H3 and 4IgB7-H3 in cancer cell lines and glioma tissues. *Oncology letters*, 10(4), pp.2204–2208.
137. Winiarska, M. et al., 2011. Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 16, pp.277–306.
138. Wolff, K.-D., Follmann, M. & Nast, A., 2012. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Arzteblatt international*, 109(48), pp.829–835.

139. Wollenberg, B., 2019. PD-1 antibodies in head-and-neck cancer. *Lancet* (London, England), 393(10167), pp.108–109.
140. Woodman, C.B.J., Collins, S.I. & Young, L.S., 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 7(1), pp.11–22.
141. Wu, L. et al., 2016. B7-H4 expression indicates poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(9), pp.1035–1045.
142. Yang, S.-W. et al., 2016. MART-10, a newly synthesized vitamin D analog, represses metastatic potential of head and neck squamous carcinoma cells. *Drug design, development and therapy*, 10, pp.1995–2002.
143. Yi, K.H. & Chen, L., 2009. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunological Reviews*, 229(1), pp.145–151.
144. Young, M.R.I. & Day, T.A., 2013. Immune regulatory activity of vitamin d3 in head and neck cancer. *Cancers*, 5(3), pp.1072–1085.
145. Yu, S. & Cantorna, M.T., 2008. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), pp.5207–5212.
146. Zandberg, D.P. & Strome, S.E., 2014. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*, 50(7), pp.627–632.
147. Zhang, Y. et al., 2015. Prognostic Significance of Programmed Cell Death 1 (PD-1) or PD-1 Ligand 1 (PD-L1) Expression in Epithelial-Originated Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine*, 94(6), p.e515.
148. Zittermann, A., 2006. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), pp.39–48.
149. Zou, W., 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature reviews. Cancer*, 5(4), pp.263–274.

7. Publikationen

Paper: **Krebs-Fleischmann HA**, Linxweiler M, Körner S, Wemmert S, Smola S, Radosa JC, Wagner M, Morris LG, Schick B, Bochen F. **Biological and prognostic effects of Vitamin D and HPV in head and neck cancer: a focus on tumor-associated immune checkpoint molecules.**

Manuscript submitted.

Poster: **Krebs-Fleischmann HA**, Bochen F, Schick B, Linxweiler M. **Einfluss von Vitamin D und HPV auf die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.**

Präsentiert auf der DGHNO-Jahrestagung 2019, 29.05.2019 bis 01.06.2019, Berlin

Krebs-Fleischmann HA, Bochen F, Schick B, Linxweiler M. **Vitamin D modulates immune checkpoint molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma patients.**

Präsentiert im Rahmen des „13. int. Young European Scientist Meeting 2019“, 13.09.2018 bis 16.09.2018, Porto, Portugal; ausgezeichnet mit dem „Honorable Mention Award - Oncology & Molecular Biology“.

8. Danksagung

Diese wissenschaftliche Arbeit wäre ohne die Unterstützung und Hilfsbereitschaft zahlreicher Personen nicht erfolgreich zustande gekommen.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für diese Gelegenheit, meine Arbeit an seiner Klinik schreiben zu dürfen, die freundliche Aufnahme und die stetige Hilfsbereitschaft sowie für die Überlassung des Arbeitsplatzes danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für das Überlassen des hochinteressanten Themas, die überragende Unterstützung bei meiner Arbeit, die jederzeit mögliche Diskussionsbereitschaft, die enorm schnelle Hilfe im Falle einer Frage und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinem Betreuer Herrn Florian Bochen, M.Sc., (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für seine exzellente Betreuung. Jederzeit gewährte er mir außerordentlich sachkundige, erfahrene und ehrliche Ratschläge zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie anregende Impulse zum kritischen Reflektieren. Dankbar anerkennen will ich auch die freundliche, stets geduldige Diskussionsbereitschaft mir methodologische Aspekte der Molekularbiologie näherzubringen. Insbesondere sein persönliches Engagement sowie seine grandiose Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zudem möchte mich besonders bei Frau Sandrina Körner, M.Sc., für ihre großzügige Hilfsbereitschaft, praktischen Hinweise und Geduld bei der Planung und Durchführung der proteinbiochemischen Analysen bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima und die stetige aufmerksame Hilfsbereitschaft während des Laboralltags möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, insbesondere bei Frau Monika Hoffmann, Frau Ulrike Bechtel, Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert und Frau Carolin Bick, bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. Richard Zimmermann sowie allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen seiner Arbeitsgruppe des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes für die Gelegenheit und Unterstützung zur Durchführung der proteinbiochemischen Experimente danken. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der Klinik für Pathologie der Universität des Saarlandes, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Rainer Bohle, Herrn PD Dr. med. Matthias Wagner und Frau Elke Stenzhorn-Niemann für die gelungene Kooperation und die Bereitstellung der Gewebeblöcke, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich ständig wohlwollend und verständnisvoll unterstützt haben.