

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

**Einfluss von Vitamin-D auf die lytische Signatur tumorinfiltrierender
Leukozyten bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im
Kopf-Hals-Bereich**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Jule Maria Feld

geb. am 07.03.1997 in Saarlouis

Meiner Familie gewidmet

Benedikt

Tag der Promotion: 08.06.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter:

PD M. Linxweiler

Prof. St. Stilgenbauer

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	10
2.1 Maligne Neoplasien	10
2.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs	11
2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie	11
2.2.2 Prävention, Diagnostik und Therapie	13
2.2.3 Molekulare Pathogenese	14
2.3 Das humane Immunsystem	16
2.3.1 Das angeborene Immunsystem	16
2.3.2 Das adaptive Immunsystem	18
2.4 Lytische Effektormoleküle des Immunsystems	19
2.5 Vitamin-D und sein Einfluss auf das Immunsystem	22
2.5.1 Vitamin-D-Versorgung	22
2.5.2 Vitamin-D – Physiologie und Funktion	23
2.5.3 Vitamin-D-Status und Definition eines Vitamin-D-Mangels	24
2.5.4 Einfluss von Vitamin-D auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem	25
2.6 Zielsetzung der Arbeit	28
3. Material und Methoden	30
3.1 Material und Herstellernachweis	30
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
3.1.2 Chemikalien	31
3.1.3 Lösungen und Puffer	31
3.1.4 Primärantikörper	32
3.2 Immunhistochemische Analysen	32
3.2.1 Fixierung des Gewebes	32
3.2.2 Etablierung	33
3.2.3 Versuchsablauf	37
3.2.4 Semiquantitative Auswertung der IHC	39
3.3 Statistische Analyse	39
3.4 Klassifikation und Differenzierung	40
3.5 Anonymisiertes Patientenkollektiv	40
4. Ergebnisse	45
4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	45

4.2 Charakterisierung der Präparate	46
4.2.1 Auswertung der T- und N-Stadien	46
4.2.2 Präparatgröße, Tumoranteil, Leukozyteninfiltration	48
4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	50
4.3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym A an HNSCCs	50
4.3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym B an HNSCCs	52
4.3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym K an HNSCCs	54
4.3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granulysin an HNSCCs	57
4.3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Perforin an HNSCCs	60
4.4 Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse	63
4.5 Überlebensanalyse	63
4.5.1 Überlebensanalyse abhängig vom Vitamin-D-Status	63
4.5.2 Überlebensanalysen abhängig von immunhistochemischen Parametern	64
5. Diskussion	66
5.1 Bedeutung von Vitamin-D und immunmodulatorischen Therapiekonzepten in der Kopf-Hals-Onkologie	66
5.2 Einfluss von Vitamin-D auf die Expression lytischer Effektormoleküle bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches	72
6. Literaturverzeichnis	78
7. Publikationen	92
8. Lebenslauf	93
9. Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

1,25 (OH) D2	Calcitriol
%	Prozent
° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CTL	CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Tetraethylendiaminoessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
et al.	und andere
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HE	Hämatoxylin/Eosin
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humaner Papillomvirus/Humane Papillomviren
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Milliliter
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM, M	Milli-, Molarität (entspricht der molaren Masse in einem Liter)
min	Minute
µg, µm, µl	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter
n	Stichprobenumfang
ng, nm, nl	Nanogramm, Nanometer
p	statistischer Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Standardisalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
UV	ultraviolettes Licht
VDM	Patientenkollektiv mit Vitamin-D-Mangel
VDA	Patientenkollektiv mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung

1. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zählen als sechst häufigste Tumorentität weltweit mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 55 % zu den Tumorerkrankungen mit sehr schlechten Prognoseaussichten. Auch in den vergangenen Jahren konnte diese eingeschränkte Überlebensrate trotz der Entwicklung neuer Therapieansätze bisher nicht wesentlich verbessert werden. Ursächlich hierfür ist zum einen die in den meisten Fällen erst sehr späte Diagnosestellung, welche die Wahl der Therapiekonzepte begrenzen und die Bestimmung des Tumorursprungs erschweren kann. Zum anderen besitzen Kopf-Hals-Tumoren immunsuppressive Eigenschaften, die unter anderem zu einer limitierten Wirkung zielgerichteter medikamentöser Therapien beitragen können. Aus diesem Grund ist es notwendig neue Methoden zu entwickeln, die eine Früherkennung der Tumore verbessern und den Patienten neue und effektivere Therapieoptionen ermöglichen. Einen möglichen Ansatz stellt dabei das Vitamin-D dar, welches mit einer immunstimulierenden sowie antitumoralen Wirkung assoziiert zu sein scheint. Verschiedene Studien konnten belegen, dass Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich gegenüber gesunden Personen unter einem deutlichen Vitamin-D-Mangel leiden, der zudem mit einer schlechteren Prognose einhergeht. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit Vitamin-D bei Kopf-Hals-Tumorpatienten die zielgerichtete antitumorale Immunabwehr beeinflussen kann.

Dazu wurden Tumorgewebeproben von 114 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten immunhistochemisch gefärbt, um das Expressionsverhalten der lytischen Effektormoleküle Granulysin, Granzym A, Granzym B, Granzym K und Perforin als Surrogatmarker für die antitumorale Aktivität zytotoxischer Immunzellpopulationen zu untersuchen. Das Patientenkollektiv gliederte sich dabei abhängig vom Vitamin-D-Serumspiegel in 53 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung sowie 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Die ausreichende Vitamin-D-Versorgung wurde im Vorfeld als 25-OH-Vitamin-D-Serumkonzentration über 15 ng/ml und der Vitamin-D-Mangel als 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml definiert. Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte anschließend mithilfe eines immunreaktiven Scores.

Die immunhistochemischen Analysen konnten eine positive Korrelation zwischen einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel und einer gesteigerten Expression der meisten lytischen Effektormoleküle bei Kopf-Hals-Tumorpatienten nachweisen. Insbesondere in den intratumoral lokalisierten Leukozyten war eine durch die suffiziente Vitamin-D-Versorgung gesteigerte Expression von Granzym B ($p = 0,0026$), Granzym K ($p = 0,0240$) und Perforin ($p = 0,0030$) zu beobachten. Bei der Betrachtung der intratumoral- und peritumoral-leukozytären Expression von Granzym A war dagegen keine Korrelation mit dem Vitamin-D-Serumspiegel festzustellen. Eine ausreichende Versorgung mit Vitamin-D führte zu einer vermehrten tumoralen Expression von Perforin ($p = 0,0023$), Granulysin ($p = 0,0109$) und tendenziell auch von Granzym K ($p = 0,1142$), was die aktivitätssteigernde Wirkung des Vitamin-D auf die gezielte antitumorale Immunreaktion unterstreicht. Weiterhin war zu

beobachten, dass eine gesteigerte tumorale Perforin-Expression mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben von Kopf-Hals-Tumorpatienten assoziiert zu sein scheint ($p = 0,0321$). Eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung führte im untersuchten Patientenkollektiv zudem im Vergleich zu den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel zu einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben von durchschnittlich 10 Monaten ($p = 0,0188$). Dies könnte zum einen durch die gesteigerte tumorale Leukozyteninfiltration bei Patienten mit suffizientem Vitamin-D-Spiegel und zum anderen durch den in dieser Arbeit analysierten Einfluss des Vitamin-D auf die zytolytische Aktivität der Leukozyten bedingt sein.

Zusammenfassend verdeutlichen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung für Kopf-Hals-Tumorpatienten von hoher therapeutischer sowie prognostischer Relevanz sein kann. Die Ergebnisse demonstrieren, dass Vitamin-D die Expression der lytischen Enzyme in der Tumorumgebung der Kopf-Hals-Tumore beeinflussen und somit die zytolytische Aktivität der tumorinfiltrierenden Leukozyten regulieren kann, wodurch eine effektivere antitumorale Immunreaktion generiert werden könnte. Weiterhin sind zusätzliche molekulargenetische Untersuchungen notwendig, welche das immunstimulierende Potenzial des Vitamin-D auch in Abhängigkeit von anderen immunmodulatorischen Einflüssen analysieren, um die genauen Wirkungsweisen des Vitamin-D zu entschlüsseln. Schließlich könnte die kostengünstige Substitution von Vitamin-D im Rahmen einer multimodalen Therapiestrategie die Effektivität immunonkologischer Therapieansätze sowie die prognostischen Aussichten von Kopf-Hals-Tumorpatienten optimieren.

1. Summary

Squamous cell carcinoma of the head and neck is the sixth most common tumor entity worldwide, with a 5-year survival rate of about 55 %, making it one of the tumor diseases with a very poor prognosis. Despite the development of new therapeutic approaches, this limited survival rate has not been improved significantly in recent years. The reason for this is, on the one hand, a very late diagnosis in most cases, which can limit the choice of therapy concepts and make it difficult to determine the origin of the tumor. On the other hand, head and neck tumors have immunosuppressive properties, which may, among other effects, contribute to a limited effect of targeted drug therapies. For this reason, it is necessary to develop new methods which improve early detection of tumors and provide patients with new and more effective treatment options. One possible approach is vitamin D, which seems to be associated with an immunostimulatory as well as antitumor effect. Various studies have shown that patients with squamous cell carcinoma of the head and neck suffer from a significant vitamin D deficiency compared with healthy people, which is moreover associated with a poorer prognosis. In this context, the present study investigated the extent to which vitamin D may influence the targeted antitumor immune response in head and neck tumor patients.

For this purpose, tumor tissue samples from 114 head and neck cancer patients were stained immunohistochemically in order to investigate the expression behavior of the lytic effector molecules granulysin, granzyme A, granzyme B, granzyme K and perforin as surrogate markers for the antitumor activity of cytotoxic immune cell populations. The patient collective was divided into 53 patients with sufficient vitamin D supply and 61 patients with vitamin D deficiency, depending on the serum vitamin-D level. Adequate vitamin D supply was defined in advance as 25-OH vitamin D serum concentration above 15 ng/ml and vitamin D deficiency as 25-OH vitamin D serum level below 10 ng/ml. Semiquantitative evaluation of immunohistochemical staining was performed subsequently using an immunoreactive score.

The immunohistochemical analyses demonstrated a positive correlation between a sufficiently high vitamin D serum level and an increased expression of most lytic effector molecules in head and neck tumor patients. In particular, in the intratumorally localized leukocytes, an increased expression of granzyme B ($p = 0.0026$), granzyme K ($p = 0.0240$) and perforin ($p = 0.0030$) was observed due to the sufficient vitamin D supply. In contrast, when intratumoral and peritumoral leukocyte expression of granzyme A was examined, there was no correlation with serum vitamin D levels. An adequate supply of vitamin D resulted in increased tumoral expression of perforin ($p = 0.0023$), granulysin ($p = 0.0109$), and tended to increase granzyme K ($p = 0.1142$), which underscores the activity-enhancing effect of vitamin D on the targeted antitumor immune response. Furthermore, it was observed that increased tumoral perforin expression seems to be associated with significantly improved overall survival of head and neck tumor patients ($p = 0.0321$). Adequate vitamin D supply also resulted in a significantly prolonged overall survival of 10 months on average in the studied patient population compared with

vitamin D deficient patients ($p = 0.0188$). This may be due to the increased tumoral leukocyte infiltration in patients with sufficient vitamin-D levels on the one hand and to the influence of vitamin D on the cytolytic activity of leukocytes analyzed in this thesis on the other hand.

In conclusion, the data collected in the present study illustrate that adequate vitamin D supply may be of high therapeutic as well as prognostic relevance for head and neck tumor patients. The results demonstrate that vitamin D may influence the expression of lytic enzymes in the tumor environment of head and neck tumors and thus regulate the cytolytic activity of tumor-infiltrating leukocytes. This may generate a more effective antitumor immune response. Furthermore, additional molecular genetic studies are needed to analyze the immunostimulatory potential of vitamin D also in relation to other immunomodulatory influences so as to decipher the exact modes of action of vitamin D. Finally, cost-effective substitution of vitamin D as part of a multimodal therapeutic strategy could optimize the effectiveness of immuno-oncological therapeutic approaches as well as the prognostic outlook of head and neck tumor patients.

2. Einleitung

2.1 Maligne Neoplasien

In vielen Ländern sind die Todesursachen durch verschiedene Erkrankungen sehr unterschiedlich, was sich unter anderem auf die unterschiedlichen Gesundheitssysteme, das spezifische Gesundheitsbewusstsein, sowie die Umweltbedingungen der Länder zurückführen lässt (World Health Organization, 2017). Dabei sind in Entwicklungsländern weiterhin Infektionserkrankungen, Geburtskomplikationen, sowie Mangelernährung für mehr als die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich, während in den Industrienationen Herzkreislauf- und Tumorerkrankungen als Todesursache dominieren (World Health Organization, 2016). Aber auch weltweit zählen neben ischämischen Herzerkrankungen und Schlaganfällen seit 15 Jahren vor allem Tumorerkrankungen zu den führenden Todesursachen, welche im Jahr 2018 bis zu 9,6 Millionen Tode verursachten (WHO, 2018). Zudem ist die Zahl der Tumorerkrankungen weltweit weiterhin deutlich steigend (World Health Organization, 2017).

Auch in Deutschland sind Herzkreislauf- und Tumorerkrankungen für knapp zwei Drittel aller Tode verantwortlich (Robert-Koch-Institut, 2016; Lampert *et al.*, 2019). Während die Inzidenz der Krebserkrankungen seit 1980 stetig zunahm, ist die Sterblichkeit sowohl an Tumor- als auch an Herzkreislaufkrankungen dagegen rückläufig, was an der veränderten Altersstruktur und der frühzeitigeren Diagnostik, sowie an neuen verbesserten Therapiestrategien liegt (Schelhase and Weber, 2007). Zu beachten ist hierbei allerdings, dass sich die Sterblichkeit an Kreislaufkrankungen zwischen 1980 und 2008 von 53% auf 42% verringerte, während die Sterblichkeit an malignen Neubildungen nur um knapp 5% sank (Gaber and Wildner, 2011; Kaatsch and Spix, 2019). Die Inzidenz maligner Tumorerkrankungen ist auch weltweit weiterhin zunehmend. Dabei ist die Prognose und damit auch die 5-Jahres-Überlebensrate stark von dem jeweiligen Land und der Tumorentität abhängig, was sich durch die Unterschiede im Zugang zu Früherkennung und optimaler Behandlung erklären lässt (Allemani *et al.*, 2015).

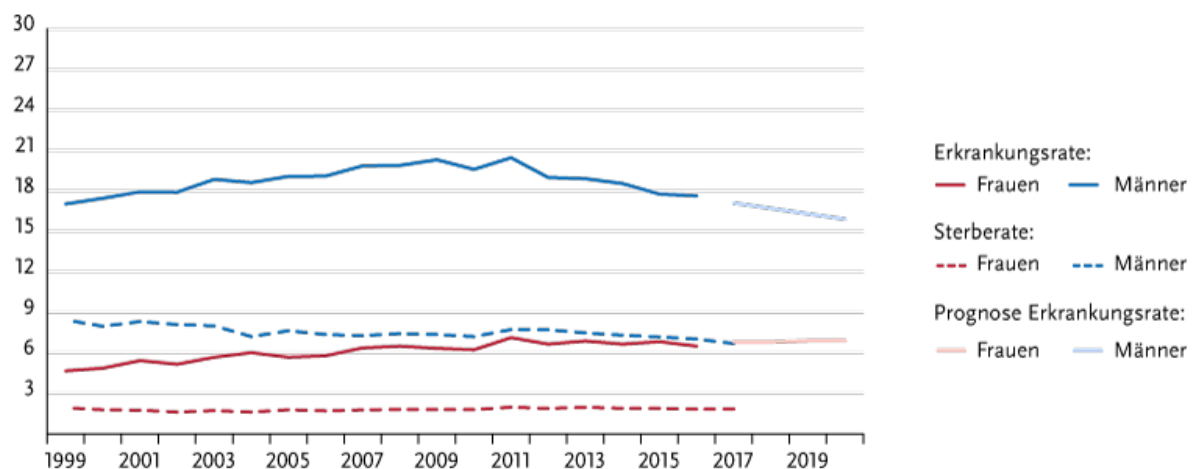
Im Jahr 2016 erkrankten über 233.000 Frauen und über 258.000 Männer in Deutschland an einer malignen Neubildung. Insgesamt knapp 300.000 Menschen starben im selben Jahr an einer Krebserkrankung. Bei Frauen sind maligne Tumorerkrankungen der Brustdrüse mit 29,5% mit Abstand am häufigsten, gefolgt vom kolorektalen Karzinom (11,1%) und dem Lungenkarzinom (9,2%). Männer dagegen sind am häufigsten von einem Prostatakarzinom (22,7%) betroffen, gefolgt von Lungenkrebs (13,9%), Darmkrebs (12,5%) und Kopf-Hals-Karzinomen (5%). Während bei den Frauen der Brustkrebs mit 17,6% auch die häufigste Tumorlokalisation aller Krebssterbefälle ausmacht, ist bei den Männern das Lungenkarzinom (23,5%) für die meisten Tumorsterbefälle verantwortlich (Kaatsch and Spix, 2019).

2.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) stehen mit knapp 5% aller Tumorentitäten bei Männern an vierter Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen mit knapp 12.500 Fällen pro Jahr in Deutschland. Frauen dagegen erkranken deutlich seltener an Kopf-Hals-Tumoren. So waren im Jahr 2016 in Deutschland knapp 4.500 Frauen von einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich betroffen. Allerdings zeigt sich seit 2011 bei den Männern ein leichter Rückgang der Erkrankungshäufigkeit, während die Inzidenz bei Frauen langfristig ansteigt (Abb. 1). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Frauen derzeit etwa 63%, die 10-Jahres-Überlebensrate nur etwa 53%. Bei Männern ist die Prognose mit einer Überlebensrate nach 5 Jahren von 47% und nach 10 Jahren von nur 35% noch deutlich schlechter. Damit ist die Prognose der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches insgesamt im Vergleich mit einigen anderen Tumorerkrankungen in Deutschland, wie beispielsweise Mamma- oder Prostatakarzinomen, als sehr eingeschränkt einzuordnen (Robert Koch-Institut, 2016; Kaatsch and Spix, 2019).

Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC), Deutschland 1999-2020



© Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut

Abbildung 1: Die Abbildung des Zentrums für Krebsregisterdaten zeigt die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten für maligne Tumore der Mundhöhle und des Rachens, eingeteilt nach dem Geschlecht, für die Jahre 1999 bis 2016/17 in Deutschland; auch eine Prognose für das Jahr 2020 wird angegeben. Während die Inzidenz der Tumore bei Männern seit 2011 rückläufig ist, steigt diese bei Frauen weiterhin leicht an. Die Mortalität dagegen verläuft nahezu konstant, lediglich ein geringer Rückgang ist bei den betroffenen Männern zu verzeichnen (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2017).

Die Tumorentität der Kopf-Hals-Karzinome gliedert sich in maligne Neoplasien der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hypopharynx, des Larynx und der Lippe, wobei die Mundhöhle und der Larynx mit 70 % die häufigsten Tumorlokalisationen ausmachen (Robert Koch-Institut, 2016). Dabei handelt es sich in über 90% der Fälle histologisch um Plattenepithelkarzinome. Lediglich zu einem geringen Teil kommen auch Adenokarzinome vor, die vor allem die Speicheldrüsen betreffen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich histologisch gesicherte Plattenepithelkarzinome untersucht.

In der Genese der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs spielen vor allem der Alkohol- und Tabakkonsum, sowie mutagene Viren vom HPV-Typ eine große Rolle. Daneben kann eine erhöhte UV-Strahlen-Exposition zur Entstehung von Lippenkarzinomen führen. Auch weitere chemische Noxen wie Asbest oder Holzstaub, sowie Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus stellen Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren dar (Reiß *et al.*, 2009; Schmoll *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2018).

Der Alkohol- oder Tabakkonsum ist für die Entstehung von knapp 80 % der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx verantwortlich. Treten beide Noxen kombiniert auf, kommt es zu einem Multiplikationseffekt und damit zu einer starken Risikoerhöhung an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken (Hashibe *et al.*, 2015). Tabakkonsumenten, die keinen Alkohol konsumieren, haben im Vergleich zu Menschen, die nie geraucht haben, bereits ein deutlich erhöhtes Risiko an einen Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken (Hashibe *et al.*, 2007). Dabei besteht eine starke Korrelation zwischen dem Grad der Nikotinexposition und dem Karzinomrisiko (Lubin *et al.*, 2007). In verschiedenen Studien lässt sich dabei am eindeutigsten der Zusammenhang zwischen isoliertem Tabakkonsum und dem Risiko an einem Larynxkarzinom zu erkranken zeigen (Lubin *et al.*, 2009; Hashibe *et al.*, 2015). Auch die steigende Zahl der an Kopf-Hals-Tumoren erkrankten Frauen lässt sich mit dem Tabakkonsum in Verbindung bringen, da der Anteil der rauchenden Frauen vor allem seit den 1960er Jahren stark anstieg (Zalewska *et al.*, 2009). Der über diese Jahre fortgesetzte Konsum von Zigaretten in Kombination mit dem physiologischen Altern führt zu der beschriebenen Erhöhung des Karzinomrisikos für Frauen (Zalewska *et al.*, 2009).

Betrachtet man den reinen Alkoholkonsum, lässt sich auch hier ein wesentlicher Einfluss auf das Risiko der Tumorentstehung feststellen (Hashibe *et al.*, 2007). Am deutlichsten zeigt sich hier eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der am Tag konsumierten Alkoholmenge und dem Risiko an einem Pharynxkarzinom zu erkranken (Hashibe *et al.*, 2015). Zudem steigt die karzinogene Wirkung des Alkohols mit seiner Konzentration. So hat hochprozentiger Alkohol, wie Spirituosen, eine deutlich stärkere karzinogene Wirkung als niedrigprozentiger Alkohol in Form von Bier oder Wein (Castellsagué *et al.*, 2004; Hashibe *et al.*, 2015).

Bei beiden Arten des Konsums, sowohl dem Tabakrauchen als auch dem Alkoholkonsum, sinkt das Tumorrisiko bei anhaltender Abstinenz. Nach etwa 20 Jahren wird so ein annähernd ähnliches Risiko, wie bei einer Person, die nie in größeren Mengen Alkohol oder Tabak konsumiert hat, erreicht (Rivera, 2015).

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) vom High-Risk-Typ, die in etwa einem Drittel aller HNSCCs vorliegt (Lewis *et al.*, 2015). In der Regel verursacht eine Infektion mit HPV gutartige Haut- und Schleimhauttumore wie Warzen oder Papillome. Von den heute bekannten Serotypen können aber auch einige ursächlich zur Entstehung von malignen Neoplasien beitragen (Doorbar *et al.*, 2012). Während die HPV-Typen 18 und 33 bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und der Typ 52 in Karzinomen der Mundhöhle eine wichtige Rolle spielen, ist HPV-16 das mit Abstand am häufigsten auftretende Karzinogen in allen HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren (Betiol *et al.*, 2013; Michaud *et al.*, 2014). Auch bezüglich der Prognose nimmt das HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinom eine Sonderrolle ein. So zeigt es sich in mehreren Studien prognostisch wesentlich günstiger als die noxeninduzierten Kopf-Hals-Tumoren (Lewis *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2016). Dies erklärt sich einerseits durch das deutlich bessere Ansprechen der HPV-assoziierten Tumoren sowohl auf Chemo- als auch auf Strahlentherapie, sowie andererseits durch das im Durchschnitt wesentlich jüngere Alter der Patienten mit HPV-bedingten Kopf-Hals-Karzinomen (Fakhry *et al.*, 2008; Ang *et al.*, 2010). Auch die in der Regel deutlich bessere Immunfunktion dieser jüngeren Patienten und die damit verbundene gesteigerte tumorale Immunzellinfiltration könnte sich hier positiv auf die Prognose der HPV-assoziierten Tumoren auswirken (Kimple *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2016b; Cheraghlou *et al.*, 2019). An dieser Stelle stellt sich deshalb die Frage, inwieweit das Immunsystem und seine Mediatoren, auch unabhängig vom HPV-Status, Einfluss auf die Tumorabwehr und damit das Gesamtüberleben der Patienten nehmen.

2.2.2 Prävention, Diagnostik und Therapie

Trotz andauernder Forschung und neuer Innovationen in Diagnostik und Therapie hat sich die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert und liegt weiterhin im Schnitt bei nur etwas über 50 % (Carvalho *et al.*, 2005; Wolff *et al.*, 2012; Wolff, Follmann and Nast, 2012). Aus diesem Grund ist es besonders wichtig weiterhin neue diagnostische Verfahren zu entwickeln und operative Methoden zu verbessern, aber auch präventive Maßnahmen einzuleiten, die bei der körpereigenen Tumorabwehr helfen. Vor dem Hintergrund, dass die Heilungsaussichten in frühen Stadien (T1-2) der Tumorerkrankung wesentlich besser sind, ist die Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren von ganz zentraler Bedeutung (Wolff, Follmann and Nast, 2012; Wiegand *et al.*, 2015). Diagnostisch wird bei Patienten mit unklaren und therapierefraktären Schleimhautveränderungen im Kopf-Hals-Bereich eine ausführliche Hals-Nasen-Ohrenärztliche Untersuchung durchgeführt, die bei bestehendem klinischem Verdacht auf ein Malignom durch eine Panendoskopie, bestehend aus Naso-, Oro- und Hypopharyngoskopie, sowie Mikrolaryngoskopie, Tracheobronchoskopie und Ösophagogastroskopie, erweitert wird. Die beschriebenen Schleimhautveränderungen zeigen sich dabei klinisch meist nicht einheitlich und können als weiße oder rote Flecken an der Mundschleimhaut, als Ulzerationen oder Schwellungen auftreten.

Auch Schmerzen, Schluckstörungen, ein persistierendes Fremdkörpergefühl, unklare Blutungen oder ein Foetor ex ore können hinweisend auf ein Plattenepithelkarzinom sein (Wolff *et al.*, 2012; Wolff, Follmann and Nast, 2012; Wiegand *et al.*, 2015). Im Rahmen der Panendoskopie können erste Rückschlüsse auf Tumorgöße und –ausdehnung gezogen und die Diagnose vor allem histologisch gesichert werden. Da der Status des Befalls der Halslymphknoten weiterhin als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren gilt, wird meist zudem eine Sonographie der Halslymphknoten durchgeführt (Teymoortash and Werner, 2012; Wolff, Follmann and Nast, 2012). Zum Ausschluss einer weiteren Metastasierung dient ein Staging mittels CT-Thorax und –Abdomen. In einigen Fällen kann dieses Staging um eine Positronen-Emissions-Tomographie(PET)-CT ergänzt werden, um Tumorrezidive besser aufspüren zu können (Wolff, Follmann and Nast, 2012; Wiegand *et al.*, 2015).

Die Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen richtet sich in der Regel nach den Vorschlägen und Entscheidungen einer interdisziplinären Tumorkonferenz unter Einbeziehung der Wünsche und Vorstellungen des Patienten. Neben der Tumorgöße und –infiltrationstiefe und dem Lymphknotenstatus, sind das Alter, der Allgemeinzustand des Patienten und seine Vorerkrankungen wichtige Faktoren zur Planung des Therapiekonzepts (Sesterhenn *et al.*, 2005). Die individuelle Therapie wird dabei auf jeden einzelnen Patienten angepasst und kann neben der operativen Entfernung des Tumors bzw. einer primären Radiochemotherapie auch adjuvante oder neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie, sowie neuere Therapiestrategien mit therapeutischen Antikörpern oder Checkpoint-Inhibitoren enthalten. Auch die Rekonstruktion ist nach großen operativen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich von großer Bedeutung (Wolff *et al.*, 2012; Wolff, Follmann and Nast, 2012; Wiegand *et al.*, 2015).

2.2.3 Molekulare Pathogenese

Für die Entstehung und Progression eines Tumors sind mehrere unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Genen notwendig, die miteinander kombiniert wirken und so das Gleichgewicht zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen stören. Dadurch kommt es über die Aktivierung der Onkogene und die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene zu einer Entdifferenzierung der Zellen und damit einem enthemmten Wachstum (Reiß *et al.*, 2009; Löffler and Petrides, 2013). Die Mutationen können dabei spontan auftreten oder durch chemische Substanzen, mutagene Viren oder ionisierende Strahlung ausgelöst werden. Auch eine familiäre Disposition, Tabak- und Alkoholkonsum und die Ernährung stellen Risikofaktoren für die Tumorentstehung dar. Außerdem steigt das Risiko an einem malignen Tumor zu erkranken deutlich mit dem Alter, da die einzelnen Zellschädigungen mit dem Alter akkumulieren (Schmoll *et al.*, 2013; Wagener and Müller, 2010).

In der Pathogenese der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs sind vor allem der Alkohol- und Tabakkonsum, sowie mutagene Viren vom HPV-Typ beteiligt (Schmol *et al.*, 2013). Die Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches und die beim Konsum von hochprozentigem Alkohol entstehenden zytotoxischen Abbauprodukte induzieren dabei DNA-Schäden in den Zellen der Mund-, Rachen- und

Larynxschleimhaut, die langfristig über die Akkumulation von Mutationen zu einer Dysregulation der Zellproliferation und damit zur Entartung der Zellen führen können (Leemans *et al.*, 2011). Für die Tumorprogression sind molekularbiologisch Mutationen in Tumorsuppressorgenen, die für die Proteine p53, p16 oder das Retinoblastom-protein (RB) kodieren, besonders bedeutsam, da diese durch die Aufhebung der Zellzykluskontrolle und eine eingeschränkte DNA-Reparatur zu einer unkontrollierten Proliferation der Tumorzelle führen (Leemans *et al.*, 2011; Löffler and Petrides, 2013). Durch die mutationsbedingte Inaktivierung von RB wird so die biologische Transkription der Tumorzelle über den Transkriptionsfaktor E2F begünstigt. Zudem führt die Inaktivierung des p53-Proteins dazu, dass der Übergang der Tumorzelle in die nächste Phase des Zellzyklus und damit in die Zellteilung nicht mehr verhindert werden kann. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches kommt hinzu, dass die Expression des Epidermalen Growth Factor Receptor (EGFR) gesteigert ist, wodurch es zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums kommt (Leeman *et al.*, 2011; Löffler and Petrides, 2013; Hof and Dörries, 2017). Durch das Zusammenwirken dieser molekularen Mechanismen werden so die Proliferation, die Angiogenese und das invasive Tumorwachstum gefördert, während die zellulären Differenzierungs- und DNA-Reparaturmechanismen sowie die Zellapoptose gehemmt werden (Löffler and Petrides, 2013; Hof and Dörries, 2017).

Eine Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) kann gutartige Haut- und Schleimhauttumore wie Warzen oder Papillome verursachen, einige Serotypen können aber auch ursächlich zur Entstehung von malignen Neoplasien beitragen (Doorbar *et al.*, 2012). Bei der Entstehung der benignen Hautveränderungen erfolgt die Infektion meist über geringste Hautläsionen, die mit erregerhaltigem Warzenmaterial in Kontakt kommen, wodurch es in den verschiedenen epithelialen Zellschichten zur Replikation des episomal vorliegenden Virus und im Stratum corneum schließlich über eine massive Virusproduktion zur Entstehung der Warze kommt (Reiß *et al.*, 2009; Doorbar *et al.*, 2012; Hof and Dörries, 2017). Die Entstehung maligner Hautveränderungen durch humane Papillomviren beruht dagegen auf einem wesentlichen Unterschied. Hier liegt das Virusgenom nicht episomal vor, sondern wird bereits in der epithelialen Basalzellschicht in die Wirtszell-DNA eingebaut (Doorbar *et al.*, 2012). Durch diese Integration geht das virale Gen E2 verloren, wodurch es durch fehlende Kontrolle zur Überexpression der viralen Proteine E6 und E7 kommt. Über eine Interaktion dieser Proteine mit den wirtszellspezifischen Proteinen kommt es zu einer sehr starken Inhibierung der antiproliferativen Tumorsuppressorproteine p53 und EB 105, die schließlich die Transformation der Wirtszelle nicht mehr verhindern können (Hochmann *et al.*, 2020). Zudem zeigen die Proteine der HPV-High-Risk-Typen, zu denen die Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 und 66 gehören, eine viel höhere Affinität zu den Rezeptoren der Basalzellen als die der Low-Risk-Typen (Hof and Dörries, 2017). Dennoch müssen weitere, noch nicht vollständig verstandene, exogene Einflüsse auf die transformierten Zellen einwirken, um daraus einen Tumor entstehen zu lassen (Doorbar *et al.*, 2012; Hof and Dörries, 2017; Hochmann *et al.*, 2020; Layman *et al.*, 2020).

2.3 Das humane Immunsystem

Die moderne Krebsbehandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs steht, wie in den vorherigen Abschnitten bereits erläutert, aufgrund begrenzter Behandlungsmöglichkeiten und meist schlechter Prognosen weiterhin vor vielen Problemen. Dies ist vor dem Hintergrund der nicht unerheblichen Inzidenz der Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland ein wichtiger Ansatzpunkt tumortherapeutischer Forschung. Dabei sollten neben den Behandlungskonzepten des bestehenden Tumors vor allem auch protektive Faktoren berücksichtigt werden, die bereits in der Tumorgenese eingreifen. Verschiedene neue Therapiemöglichkeiten sind notwendig, um die Behandlung der Kopf-Hals-Karzinome zu verbessern. Dabei sollten aber auch bereits bestehende Therapiekonzepte genutzt werden, deren Wirkung durch supportive Komponenten ausgebaut werden könnte, um damit das Gesamtüberleben der Patienten zu verbessern.

Ein wichtiger Angriffspunkt neuer onkologischer Therapieansätze ist dabei das körpereigene Immunsystem und seine gezielte antitumorale Aktivität (Ferris, 2015; Kansy *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2016). Aus diesem Grund wird im Weiteren detaillierter auf das menschliche Immunsystem und seine antitumorale Immunreaktion eingegangen.

Das humane Immunsystem besteht aus lymphatischen Organen, unterschiedlichen Zelllinien und Signalkaskaden, sowie lytischen Effektormolekülen, die funktionell miteinander verbunden, Krankheitserreger erkennen und eliminieren. Darüber hinaus ist das Immunsystem auch in der Lage, fehlregulierte zelluläre Prozesse der körpereigenen Zellen zu erkennen und diese zu bekämpfen, was die Grundlage der körpereigenen immunologischen Tumorabwehr darstellt (Chen and Mellman, 2013). Eine Immunreaktion kann dabei unspezifisch im Sinne des angeborenen Immunsystems oder erregers- bzw. noxenspezifisch im Sinne des adaptiven Immunsystems ablaufen. Beide Formen unterteilen sich wiederum in einen humoralen Anteil aus löslichen Faktoren und einen zellulären Anteil (Rink *et al.*, 2015).

2.3.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem als erste Instanz der Immunreaktion wird unabhängig vom eindringenden Erreger aktiviert (Rink *et al.*, 2015). Als erster Abwehrmechanismus schützen die Haut und die Schleimhäute als biochemische und physische Barriere den Körper vor dem Eindringen von Krankheitserregern. Diese erste äußere Schutzwirkung wird durch eine Reihe löslicher Komponenten unterstützt. Dazu zählen die antimikrobiell wirkenden Defensine und Lysozym, sowie die Cathelicidine, die zusätzlich zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen. Auch die antiviral wirkenden Interferone zählen zu den löslichen Faktoren des angeborenen Immunsystems (Rink *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018).

Eine weitere Komponente von großer Bedeutung für die unspezifische Immunabwehr ist das Komplementsystem. Es besteht aus über 30 Glykoproteinen, sogenannten Komplementfaktoren, die sich über eine Interaktionskaskade aktivieren (Murphy and Weaver, 2018). Die Aktivierung der Komplementkaskade kann dabei auf drei verschiedenen Arten erfolgen: dem klassischen Weg, dem alternativen Weg und dem Lektinweg. Die Wege unterscheiden sich dabei im Wesentlichen in ihrem initialen Aktivierungsmechanismus und in ihrer Abhängigkeit von einem Antikörper. Alle drei Wege führen aber schließlich zur Bildung eines Membrane Attack Complex (MAC), der eine Pore in der Membran des Pathogens bildet und so die Lyse der Zielzelle auslöst. Zudem können bestimmte Komplementfaktoren die Oberfläche von Pathogenen markieren (Opsonisierung), um diese für Immuneffektorzellen leichter zugänglich zu machen (Rink *et al.*, 2015; Hof and Dörries, 2017).

Die zelluläre Komponente der angeborenen Immunabwehr wird durch Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verkörpert (Hof and Dörries, 2017). Die heterogene Gruppe der Granulozyten, bestehend aus neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, sorgt dabei für eine möglichst schnelle Beseitigung apoptotischer Zellen und anderer pathogener Organismen, wie Bakterien, Pilze oder parasitäre Würmer. Dies geschieht durch Phagozytose (Rink *et al.*, 2015). Die Makrophagen und dendritischen Zellen dagegen zählen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) des unspezifischen Immunsystems. Makrophagen reifen dabei aus den im Blut zirkulierenden Monozyten heran und sorgen in den peripheren Geweben für die Eliminierung von Pathogenen und apoptotischen, endogenen Zellpopulationen durch Phagozytose. Zu geringeren Anteilen sind sie aber auch in der Lage, exogene Antigene nach intrazellulärer Prozessierung auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und damit die T-Zellen der adaptiven Immunabwehr zu aktivieren. Durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und weiterer akute Phase Proteine beschleunigen sie zudem die Migration neutrophiler Granulozyten und regulieren die Zellproliferation von Immunzellen (Rink *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018). Die dendritischen Zellen, als potenteste antigenpräsentierende Zellen, wandern nach Antigenkontakt über die Lymphflüssigkeit in regionale Lymphknoten, um dort die Peptidfragmente der aufgenommenen Erreger den T-Zellen zu präsentieren. Damit bilden sie das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr (Rink *et al.*, 2015; Hof and Dörries, 2017).

Die lymphozytären natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bekämpfen als Teil der unspezifischen Immunantwort, Körperzellen, die keine MHC-I-Moleküle tragen; meist viral-infizierte Zellen oder Tumorzellen. Dabei besitzen sie keine antigenspezifischen Rezeptoren, sondern eine Vielzahl von Rezeptoren zur Erkennung von Zielzellen. Das Verhältnis von aktivierenden zu hemmenden Rezeptoren bestimmt dabei die lytische Aktivität der NK-Zellen (Moretta *et al.*, 2002). Da die Entartung einer Zelle zur Tumorzelle meist mit einem Verlust oder einer deutlich verminderten Expression von MHC-I-Molekülen einhergeht und es so zu einer aktivierenden Interaktion zwischen Tumor- und NK-Zelle kommt, vermittelt die natürliche Killerzelle eine zytotoxische Anti-Tumor-Antwort (Murphy and Weaver, 2018). Bei der Interaktion zwischen NK-Zelle und Zielzelle kommt es zur Ausbildung einer

immunologischen Synapse, über welche die NK-Zelle bei Aktivierung die Lyse der Zielzelle auslöst. Dies erfolgt über die Exozytose von lytischen Effektormolekülen wie Perforin, Granzymen und Granulysin, auf die im weiteren Verlauf noch näher eingegangen wird (Rink *et al.*, 2015; Hof and Dörries, 2017).

2.3.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem beruht auf der Fähigkeit, spezifisch auf nahezu jedes eintretende Pathogen reagieren zu können. Dies erfolgt über die löslichen Faktoren der adaptiven Immunantwort, die Antikörper (Murphy and Weaver, 2018). Diese werden innerhalb weniger Tage nach Erstkontakt mit einem Pathogen von den B-Lymphozyten gebildet. Nach diesem ersten Kontakt bilden sich Gedächtniszellen aus, die bei erneuter Pathogenexposition eine schnellere Immunantwort auslösen können. Den Antikörpern ist es dabei über ihre variable Region möglich, nahezu jedes Antigen spezifisch zu binden. Die humanen Antikörper lassen sich in fünf verschiedene Immunglobulinklassen unterteilen. IgM wird bei einer primären Immunantwort zuerst gebildet und gilt daher als Marker einer akuten Infektion. Die IgM-Monomere besitzen aufgrund ihrer hohen Anzahl an Bindungsstellen eine hohe Avidität und können beispielsweise mehrere Bakterien gleichzeitig binden. So genügt bereits ein IgM-Molekül, um das Komplementsystem zu aktivieren. IgG ist das typische Immunglobulin der Sekundärantwort und stellt mit 75% den Hauptanteil der Antikörper im Blut dar. Es ist für die Opsonisierung und Neutralisierung von bakteriellen und viralen Pathogenen zuständig und kann ebenfalls Komplementfaktoren aktivieren. Sezerniertes IgA ist das Hauptimmunglobulin der Körpersekrete und befindet sich vor allem in der Tränenflüssigkeit, auf Schleimhäuten und in der Muttermilch. Dort sorgt es für einen effektiven Schutz gegen die Schleimhaut befallende Mikroorganismen. IgE dient vor allem der Abwehr von Parasiten und ist an der allergischen Reaktion vom Soforttyp beteiligt, während IgD in erster Linie zur B-Zell-Reifung beiträgt (Rink *et al.*, 2015; Hof and Dörries, 2017).

Der zelluläre Anteil des adaptiven Immunsystems wird durch die im Knochenmark gebildeten T- und B-Lymphozyten verkörpert. Kommt es zur Exposition mit einem Pathogen, wird dieses von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und über MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentiert. Die im Thymus selektierten T-Zellen, die einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) besitzen, mit dem sie die peptidbeladenen MHC-Moleküle binden können, treffen nun auf diese prozessierten Antigene und starten damit ihren Aktivierungsprozess. Neben dieser Interaktion zwischen MHC-Komplex und T-Zell-Rezeptor, wirken weitere stimulatorische und inhibitorische Faktoren auf die T-Zellen ein, die deren Differenzierungsvorgänge beeinflussen (Rink *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018). Durch die unterschiedliche Expression von Membranproteinen lassen sich die T-Lymphozyten in verschiedene Subtypen unterteilen. So tragen die T-Helferzellen CD4-Moleküle auf ihrer Oberfläche, mit denen sie die MHC-II-Komplexe der antigenpräsentierenden Zellen binden können. Über diese Interaktion kommt es zu einer Aktivierung der T-Helferzelle, die in einer

Zytokinausschüttung und erhöhten Proliferationsrate resultiert. Durch die Subpopulation der TH1-Zellen kommt es so zur zellulären proinflammatorischen Immunreaktion, während die TH2-Zellen naive B-Zellen aktivieren und so die humorale Immunantwort vermitteln. Eine weitere Gruppe der T-Lymphozyten exprimiert neben CD4 vor allem CD25, FOXP3 und CTLA-4 auf ihrer Oberfläche. Diese regulatorischen T-Zellen besitzen eine supprimierende Wirkung auf Immunreaktionen und sind über die Ausschüttung inhibitorischer Zytokine maßgeblich an dem Aufbau einer tumorvermittelten Immunsuppression beteiligt (Rink *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2016). Die Hauptaufgabe der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen besteht in der Abtötung viral infizierter oder tumorös entarteter körpereigener Zellen. Dazu interagiert der T-Zell-spezifische Rezeptor der CD8⁺-Zelle mit MHC-I-Molekülen, die von allen kernhaltigen endogenen Zellen exprimiert werden. Da die infizierten oder entarteten Zellen die viralen oder veränderten eigenen Peptidfragmente in den MHC-I-Komplexen auf ihrer Oberfläche präsentieren, erkennt die zytotoxische T-Zelle die Veränderung und wird so aktiviert. Folglich kommt es zur Ausschüttung lytischer Effektormoleküle wie Perforin und Granzyme, mit zytotoxischer und apoptotischer Wirkung auf die Zielzelle (Rink *et al.*, 2015; Hof and Dörries, 2017). B-Lymphozyten werden im Knochenmark aus lymphatischen Stammzellen gebildet. Bei ihrem Übergang vom Knochenmark in das lympho-hämatogene System verfügen sie über einen reifen B-Zell-Rezeptor in Form eines membranständigen Antikörpers. Mit diesem Rezeptor binden sie lösliche Fremdanigene und präsentieren diese nach intrazellulärer Prozessierung auf ihren MHC-II-Molekülen. Über die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor einer T-Helferzelle und konsekutiver Zytokinausschüttung kommt es zur Aktivierung der B-Zelle. Diese wird dadurch zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in eine Plasmazelle angeregt. Die somatische Rekombination von Gensegmenten im Reifungsvorgang der B-Zellen ist dabei für die Vielfalt der von den Plasmazellen produzierten Antikörper verantwortlich (Rink *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018).

2.4 Lytische Effektormoleküle des Immunsystems

Die zytotoxische Immunreaktion zur Abwehr von eindringenden Pathogenen und körpereigenen entarteten Zellen beruht auf der Ausschüttung lytischer Effektormoleküle durch die NK-Zellen und die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), wodurch die Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird (Rink *et al.*, 2015). Die lytischen Enzyme Perforin, Granulysin und die Granzyme sind in den CTL und NK-Zellen in ihrer aktiven Form in zytotoxischen Granula gespeichert, um ihre lytische Aktivität vor Eintritt in die Zielzelle zu verhindern. Kommt es nun zum Kontakt zwischen zytotoxischer Immunzelle und Zielzelle, wird die Degranulierung ausgelöst (Murphy and Weaver, 2018). Dazu bildet sich eine immunologische Synapse, in welche die Granula-Proteine freigesetzt werden. Perforin bildet dabei kleine Poren in der Membran der Zielzelle, wodurch es zu einem Calciumeinstrom kommt, der es den Granzymen und Granulysin ermöglicht durch Endozytose in die Zielzelle aufgenommen zu werden (Catalfamo and Henkart, 2003; Rink *et al.*, 2015; Voskoboinik *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018). Die Granzyme lösen anschließend durch verschiedene Wege die Apoptose der Zielzelle aus. Granzym A und Granzym

B stellen dabei die häufigsten Vertreter der Granzyme dar (Rink *et al.*, 2015). Granzym A löst den apoptotischen Zelltod völlig unabhängig von den eigentlichen Mediatoren der Apoptose, den Caspasen, aus, indem es die Mitochondrien schädigt (Raja *et al.*, 2003; Chowdhury and Lieberman, 2008; Rudd-Schmidt *et al.*, 2019). Auf eine ähnliche Weise führt auch Granzym K unabhängig von den Caspasen zur Apoptose der Zielzelle, wobei die genauen Wirkmechanismen hier noch nicht bekannt sind (Chowdhury and Lieberman, 2008; Wensink *et al.*, 2016). Granzym B dagegen spaltet Proteine und aktiviert so direkt die zentrale Caspase-3, wodurch eine proteolytische Caspasekaskade ausgelöst wird, die letztlich zum DNA-Abbau in der Zielzelle führt (Rink *et al.*, 2015). Darüber hinaus schädigt Granzym B durch Proteinspaltung die äußere Mitochondrienmembran, wodurch apoptosefördernde Moleküle wie Zytochrom C freigesetzt werden (Chowdhury and Lieberman, 2008; Murphy and Weaver, 2018; Rudd-Schmid *et al.*, 2019). Als weiteres lytisches Effektormolekül besitzt Granulysin antimikrobielle Aktivität indem es die Membran der Bakterienzelle angreift und so deren osmotische Lyse auslöst (Murphy and Weaver, 2018). Zudem gelangt Granulysin mithilfe von Perforin in das Zytosol seiner Zielzelle, wodurch es zu einer Schädigung der Mitochondrienmembran und Freisetzung von Zytochrom C und weiteren apoptoseinduzierenden Faktoren kommt (Clayberger and Krensky, 2003; Sparrow and Bodman-Smith, 2020). Dieser Mechanismus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

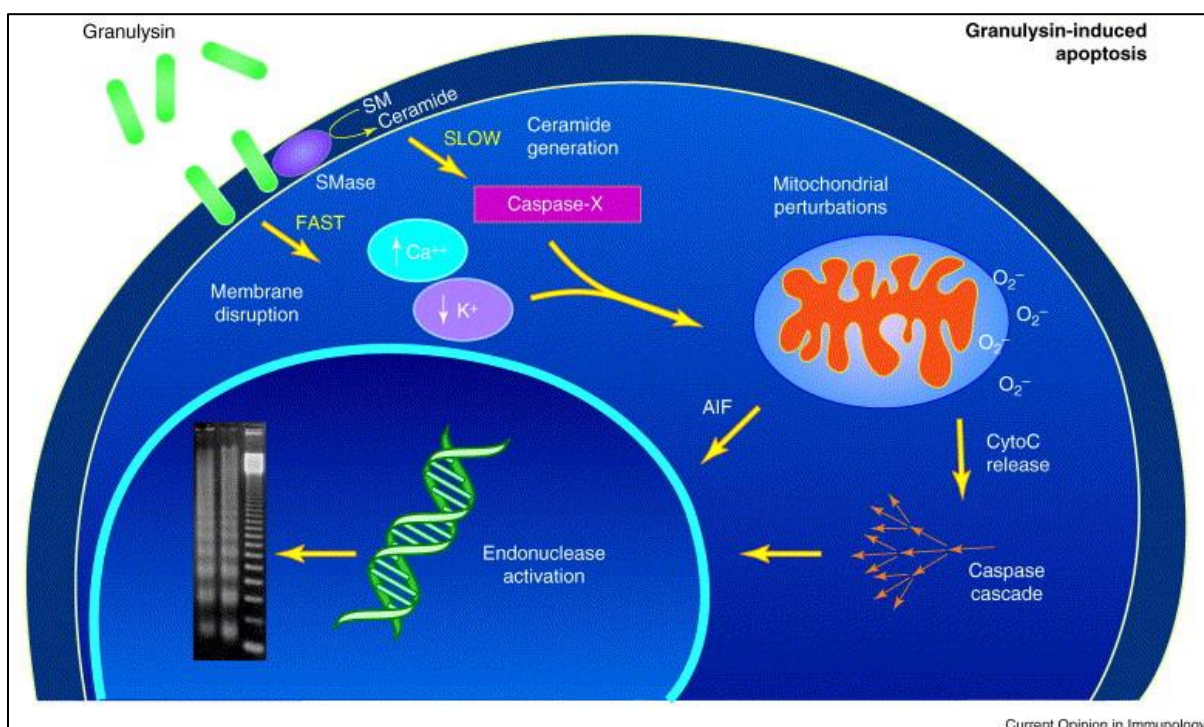


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt die durch Granulysin induzierte Lyse einer Tumorzelle. Nach Bindung an die Zellmembran löst Granulysin einen Anstieg des intrazellulären Calciums und einen Abfall des intrazellulären Kaliums aus. Zudem kommt es durch die Schädigung der Mitochondrien zur Freisetzung von Zytochrom C (CytoC) und weiteren apoptose-induzierenden Faktoren (AIF), was letztlich über die Aktivierung der Caspasen und Endonukleasen zum Zelltod durch Apoptose führt (Clayberger and Krensky, 2003).

In Studien zeigte sich außerdem, dass Granulysin auch über eine Spaltung von Proteinen verschiedene Caspasen aktivieren und so die Apoptose auslösen kann. Welche Caspasen hierbei betroffen sind und über welchen genauen Mechanismus die Aktivierung abläuft, ist allerdings noch nicht bekannt (Saini *et al.*, 2011).

Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten zudem die Bedeutung dieser lytischen Effektormoleküle in der immunologischen Tumorabwehr, sowie der Behandlung und Prognose maligner Erkrankungen nachweisen (Al-Wasaby *et al.*, 2015; Mosconi *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). In Studien zur Behandlung der fortgeschrittenen akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) konnte dem bispezifischen, monoklonalen Antikörper Blinatumumab so ein verlängernder Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zur gängigen Chemotherapie nachgewiesen werden (Topp *et al.*, 2015; Kantarjian *et al.*, 2017). Dabei greift Blinatumumab an CD3-positiven T-Zellen an und ermöglicht diesen die CD19-positiven ALL-Blasten über die Ausschüttung ihrer lytischer Enzyme zu eliminieren (Löffler *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2005). Im Mausmodell zeigt Granulysin zudem zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzellen von Patienten mit einem B-Zell-Lymphom, während es die gesunden peripheren Blutzellen nicht angreift (Al-Wasaby *et al.*, 2015). Des Weiteren korreliert die Granulysin-Expression mit der Prognose, dem Progress und dem Gesamtüberleben von Tumorpatienten (Kishi *et al.*, 2002; Sparrow and Bodman-Smith, 2020). Dieser Zusammenhang konnte insbesondere auch für Patienten mit nasopharyngealen Tumoren belegt werden (Lin *et al.*, 2016). Auch für Perforin und die Granzyme konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. So zeigte sich, dass bereits leichte Einschränkungen der Perforin-Funktion mit der Langzeitentwicklung von malignen Tumoren korrelieren (Backes *et al.*, 2018). Zudem stellt sich die wichtige Rolle der Granzyme für die antitumorale Immunreaktion in ihrer Assoziation mit einer verbesserten Prognose in verschiedenen Tumorentitäten dar (Costa *et al.*, 2011). Verschiedene Studien konnten außerdem speziell für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle ein längeres Gesamtüberleben, sowie eine geringere Metastasierung in die Lymphknoten bei Patienten mit einer höheren peritumoralen Granzym-B-Konzentration nachweisen (Costa *et al.*, 2010; Taghavi *et al.*, 2013). Das nachgewiesene antitumorale Potential der Co-Expression von Perforin und Granzymen (Li *et al.*, 2014), sowie die Möglichkeit über spezifische monoklonale Antikörper das zytotoxische Potential der T-Zellen gezielt auf die Tumorzellen richten zu können (Kantarjian *et al.*, 2017), könnte so in Zukunft auch Grundlage neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sein.

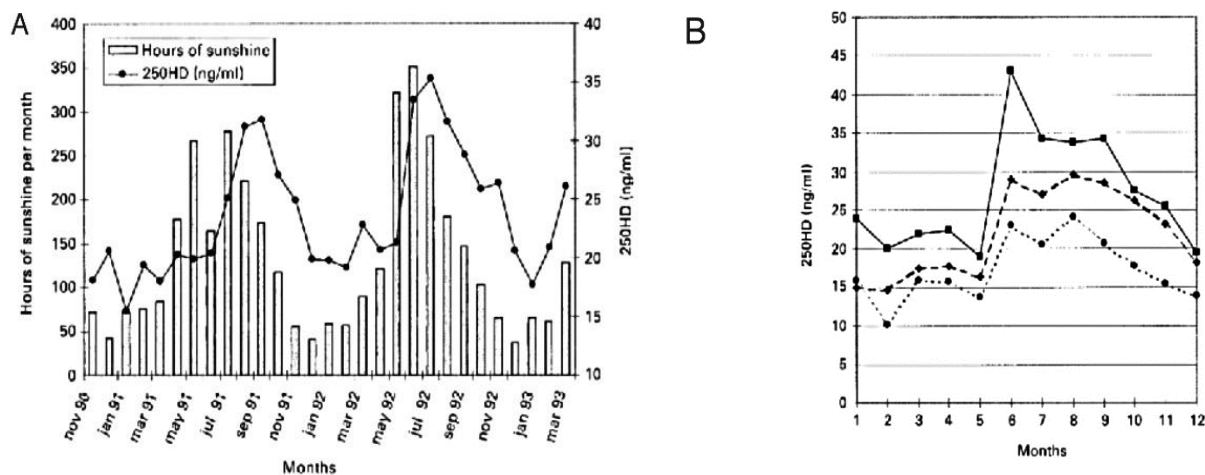
2.5 Vitamin-D und sein Einfluss auf das Immunsystem

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erläutert, ist das körpereigene Immunsystem und seine gezielte antitumorale Aktivität ein wichtiger Angriffspunkt neuer onkologischer Therapieansätze (Ferris, 2015; Kansy *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2016). Die immunonkologische Forschung sollte deshalb weiter vorangetrieben werden, um die Wirkung der bestehenden Therapiekonzepte durch supportive Komponenten auszubauen und dabei auch protektive Faktoren zu berücksichtigen, die bereits in der Tumorgenese eingreifen.

In Bezug dazu haben viele verschiedene Studien einen großen Einfluss von Vitamin-D auf das Immunsystem (Mora *et al.*, 2008; Baeke *et al.*, 2010; Prietl *et al.*, 2013; Kongsbak *et al.*, 2014) und seine Funktion im Rahmen der Anti-Tumor-Immunreaktion festgestellt (Walker *et al.*, 2012; Young and Day, 2013a). Darüber hinaus konnten einige Studien bereits nachweisen, dass Vitamin-D, als potenzieller supportiver Faktor, das Gesamtüberleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren verbessern kann (Pilz *et al.*, 2009; Gugatschka *et al.*, 2011; Vaughan-Shaw *et al.*, 2017; Bochen *et al.*, 2018). Aus diesem Grund wird im Weiteren detaillierter auf das Vitamin-D und seine Eigenschaften eingegangen.

2.5.1 Vitamin-D-Versorgung

Um eine suffiziente Versorgung mit Vitamin-D sicherzustellen, stehen dem menschlichen Körper verschiedene Quellen zur Verfügung. Nahrungsmittel wie Fisch (Lachs, Makrele oder Hering) oder sonnengetrocknete Pilzen können dabei als Vitamin-D-Quelle dienen, welche vom menschlichen Darm unterschiedlich effektiv resorbiert werden können (Keegan *et al.*, 2013; Lopez Payares and Ali, 2015; Holick, 2017). Die körpereigene Synthese mithilfe von Sonnenlicht sorgt allerdings für den größten Anteil der Vitamin-D-Versorgung (Wacker and Holick, 2013; Holick, 2016). Folglich können Jahres- bzw. Tageszeiten, sowie der geographische Breitengrad einen großen Einfluss auf die endogene Vitamin-D-Produktion nehmen (Abb. 3). Der bei einem Wohnsitz in der nördlichen Hemisphäre häufig zu beobachtende Vitamin-D-Mangel lässt sich aber nicht nur auf die fehlende Sonnenlichtexposition zurückführen, sondern wird auch durch genetische Determinanten und die Pigmentierung der Haut beeinflusst (Holick, 2013; Prietl *et al.*, 2013; Borel, Caillaud and Cano, 2015). So benötigen Menschen mit einem Hauttyp IV eine wesentlich länger andauernde Exposition von Sonnenlicht um ausreichend Vitamin-D zu synthetisieren als Menschen mit helleren Hauttypen (Holick, 2017).



© 2008 American Society for Clinical Nutrition

Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der 25-Hydroxyvitamin-D-Synthese von der monatlichen Anzahl an Sonnenstunden (A), sowie die saisonale Fluktuation des 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegels in Abhängigkeit von der Sonnenexposition (B): ■ – reguläre Sonnenlichtexposition, ◆ - gelegentliche Sonnenlichtexposition, ● – Vermeidung direkter Sonnenlichtexposition (Holick, 2008)

2.5.2 Vitamin-D – Physiologie und Funktion

Die körpereigene Produktion von Vitamin-D₃ beinhaltet sowohl fotochemische Prozesse in der Haut, als auch enzymatische Prozesse in unterschiedlichen Organsystemen (Löffler and Petrides, 2014). 7-Dehydrocholesterin (Ergosterol) wird dabei als Ausgangssubstanz in der Haut durch Einwirkung von Sonnenlicht der Wellenlänge 290 - 315 nm in Cholecalciferol (Vitamin-D₃) umgewandelt. Durch die Bindung an das Vitamin-D-bindende-Protein (VDBD) im Blut gelangt das Vitamin-D₃ zur Leber, wo es mithilfe der 25-Hydroxylase (CYP27A1) zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert wird. In der Niere erfolgt anschließend die Hydroxylierung am C-1-Atom durch die mitochondriale 1 α -Hydroxylase zur biologisch aktiven Form, dem 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Dusso *et al.*, 2005; Löffler and Petrides, 2013). Auch andere Organe und Gewebe verfügen über die 1 α -Hydroxylase. Allerdings wirkt das dort gebildete 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) eher lokal und macht nur einen geringen Teil des im Blut zirkulierenden Calcitriols aus (Dusso *et al.*, 2005; Carlberg, 2014).

Die Beeinflussung der Calciumhomöostase zählt zu einer der Hauptwirkungen des Vitamin-D (Prietl *et al.*, 2013). So sorgt Vitamin-D über eine gesteigerte intestinale Calcium- und Phosphatresorption, eine gesteigerte renale Calciumabsorption und eine gesteigerte Osteoklastenaktivität für eine Erhöhung des Plasmacalciumspiegels. Zudem supprimiert Calcitriol die parathyreoidale Parathormonproduktion und steigert die Knochenmineralisierung (Löffler and Petrides, 2013; Prietl *et al.*, 2013). Bei älteren Menschen kann so eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung nicht nur das Sturzrisiko senken, sondern auch über eine erhöhte Knochendichte die Häufigkeit von Frakturen reduzieren (Broe *et al.*, 2007). Neben den Wirkungen auf diese Hauptzielorgane (Niere, Knochen, Darm), gehören die Stimulierung der Differenzierung hämatopoetischer und epidermaler Zelltypen und die Modulation des Immunsystems zu den weiteren Funktionen des Vitamin-D (Prietl *et al.*, 2013). Auf molekularer Ebene

wirkt Calcitriol über einen intranukleären Vitamin-D-Rezeptor als genexpressionsregulierender Transkriptionsfaktor auf verschiedene spezifische Gene. Dabei bindet der Vitamin-D-Rezeptor (VRD) als Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) die entsprechenden Elemente der DNA im Zielgewebe (Löffler and Petrides, 2013; Carlberg, 2014). Diese Vitamin-D-Response-Elements (VDRE) konnten in den Promotorregionen zahlreicher Zielgene nachgewiesen werden, was die multimodalen physiologischen Effekte des Vitamin-D erklärt (Bouillon *et al.*, 2008). Die Expression auf verschiedenen Immunzellen lässt auf eine ausgeprägte Wirkung auf das Immunsystem schließen; so wird unter anderem die antibakterielle Aktivität des Immunsystems stimuliert (Baeke *et al.*, 2010) und das Erkrankungsrisiko an Autoimmunerkrankungen gesenkt (Dankers *et al.*, 2017).

2.5.3 Vitamin-D-Status und Definition eines Vitamin-D-Mangels

Studien zufolge leiden weltweit ca. 1 Milliarde Menschen an einem Vitamin-D-Mangel (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009), der sich bei Kindern vor allem im Krankheitsbild der Rachitis mit Störungen des Skelettwachstums äußert. Zur Darstellung der Vitamin-D-Versorgung eines Menschen dient die Bestimmung des 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegels, da es sich um die Speicherform handelt, welche die mittel- und langfristige Versorgung des Körpers gewährleistet. Darüber hinaus beträgt die Halbwertszeit von 25-Hydroxyvitamin-D₃ 2-3 Wochen, wodurch es eine geringere Schwankungsbreite aufweist, als das aktive 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ mit einer Halbwertszeit von nur 4-6 Stunden (Holick, 2009; Heaney, 2012). Lediglich bei dem Verdacht auf eine Stoffwechselstörung in der Vitamin-D-Synthese, kann es ergänzend sinnvoll sein auch das biologisch aktive 1,25-OH₂-Vitamin-D₃ zu bestimmen (Prietl *et al.*, 2013).

Als ein Vitamin-D-Mangel wird von vielen Experten ein 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von unter 20 ng/ml (50nmol/L) definiert (Holick, 2007; Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009). Über diese Definition wird allerdings weltweit derzeit rege diskutiert, da verschiedene Studien davon ausgehen, dass auch Werte von 21-29 ng/ml eine relative Vitamin-D-Insuffizienz darstellen (Heaney *et al.*, 2003; Holick, 2007) und damit erst Werte von mindestens 30 ng/ml eine optimale Vitamin-D-Versorgung definieren (Holick, 2017; Sempos *et al.*, 2018). Allgemein anerkannt ist aber, dass ein 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml einen klinisch manifesten Vitamin-D-Mangel darstellt, der auch mit muskulo-skeletalen Folgen in Form von Muskelschwäche, Knochenschmerzen und Skelettdeformationen einhergeht (Van Schoor and Lips, 2011).

Doch auch bei der Form der Supplementierung gibt es derzeit keinen internationalen Konsens. Während die Internationale Endokrine Gesellschaft eine Dosierung von 10.000 IE/Tag für angemessen und sicher hält, liegen die Empfehlungen des medizinischen Instituts der USA mit 4.000 IE/Tag deutlich darunter. Die Europäische Behörde für Lebensmittel ist sogar der Meinung, dass nur Mengen unter 4.000 IE/Tag als tolerierbar und sicher angesehen werden können (Holick *et al.*, 2011; Battault *et al.*, 2013; Holick, 2017). Zu einer Vitamin-D-Intoxikation mit Hyperkalzämie und Organverkalkungen kann es ab einer

Konzentration im Serum von 150 ng/ml kommen. Die meisten bestätigten Fälle einer Intoxikation sind aber auf die Einnahme freiverkäuflicher Vitamin-D-Präparate zurückzuführen, die deutlich mehr als die angegebene Menge Vitamin-D enthielten und so zur unbeabsichtigten Einnahme von mehr als 40.000 IE/Tag führten (Vieth, 2007; Zittermann *et al.*, 2012). Aus diesem Grund kann auch eine längerfristige Einnahme von 10.000 IE/Tag als ungefährlich betrachtet werden. Aktives Vitamin-D (Calcitriol) sollte aber, aufgrund der besonders großen Gefahr der Hypercalcämie, nur im Rahmen besonderer Indikationen, wie beispielsweise einem Hypoparathyreodismus, eingesetzt werden (Vieth, 2007).

In den USA und in einigen Teilen Europas wird der Anteil der Bevölkerung mit einer nicht ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (10 - 29 ng/ml) bzw. mit einem definitiven Vitamin-D-Mangel (< 10 ng/ml) mittlerweile auf 30 – 50 % geschätzt (Holick, 2017). Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (13. DGE-Ernährungsbericht, 2016) leiden in Deutschland sogar etwa 63 % der Einwohner an einem Vitamin-D-Mangel (< 20 ng/ml), der zu großen Teilen auf eine unzureichende Sonnenlichtexposition durch die geographische Lage zurückzuführen ist.

2.5.4 Einfluss von Vitamin-D auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem

In den letzten Jahren konnte die Bedeutung einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung in der Behandlung und Prävention einiger verschiedener Erkrankungen in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden (Holick, 2004; Zittermann, 2006; Bouillon *et al.*, 2008). Eine besondere Bedeutung erhält Vitamin-D dabei in seinem Einfluss auf die Prognose und das Gesamtüberleben der Patienten (Autier and Gandini, 2007). Des Weiteren konnte anhand einiger Studien eine Relation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und dem Risiko an einem malignen Tumor zu erkranken bestätigt werden (Moukayed and Grant, 2017). Insbesondere für kolorektale Karzinome konnten prospektive Studien ein erniedrigtes Erkrankungsrisiko und eine bis zu 30 % niedrigere Mortalität für Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel über 20 ng/ml nachweisen (Garland *et al.*, 2006; Giovannucci *et al.*, 2006). Aber auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs ist die ausreichende Vitamin-D-Versorgung von großer Bedeutung. So korreliert auch hier ein erniedrigter Vitamin-D-Serumspiegel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, sowie einer schlechteren Prognose für HNSCC-Patienten (Satake *et al.*, 2003; Fanidi *et al.*, 2016; Moukayed and Grant, 2017). Zudem haben Studien der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes ergeben, dass HNSCC-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Plattenepithelkarzinom eine deutlich höhere Inzidenz eines Vitamin-D-Mangels aufweisen. Hier lagen die Durchschnittswerte des Patientenkollektivs mit einem Kopf-Hals-Karzinom bei 14,1 ng/ml (Abb. 4A), während der durchschnittliche 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel der Kontrollgruppe bei 23,7 ng/ml (Abb. 4B) deutlich darüber lag. Auch in der statistischen Auswertung zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Vitamin-D-Versorgung der beiden Kollektive (Abb. 4C). Die HNSCC-Patienten mit einem ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegel hatten zudem signifikant weniger befallene Lymphknoten (Abb. 4D) und ein deutlich besseres Gesamtüberleben als die Patienten

mit einem niedrigeren Vitamin-D-Serumspiegel, was auf die verlaufs- und prognosemodulierende Rolle des Vitamin-D hinweist (Bochen *et al.*, 2018). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien (Orell-Kotikangas *et al.*, 2012).

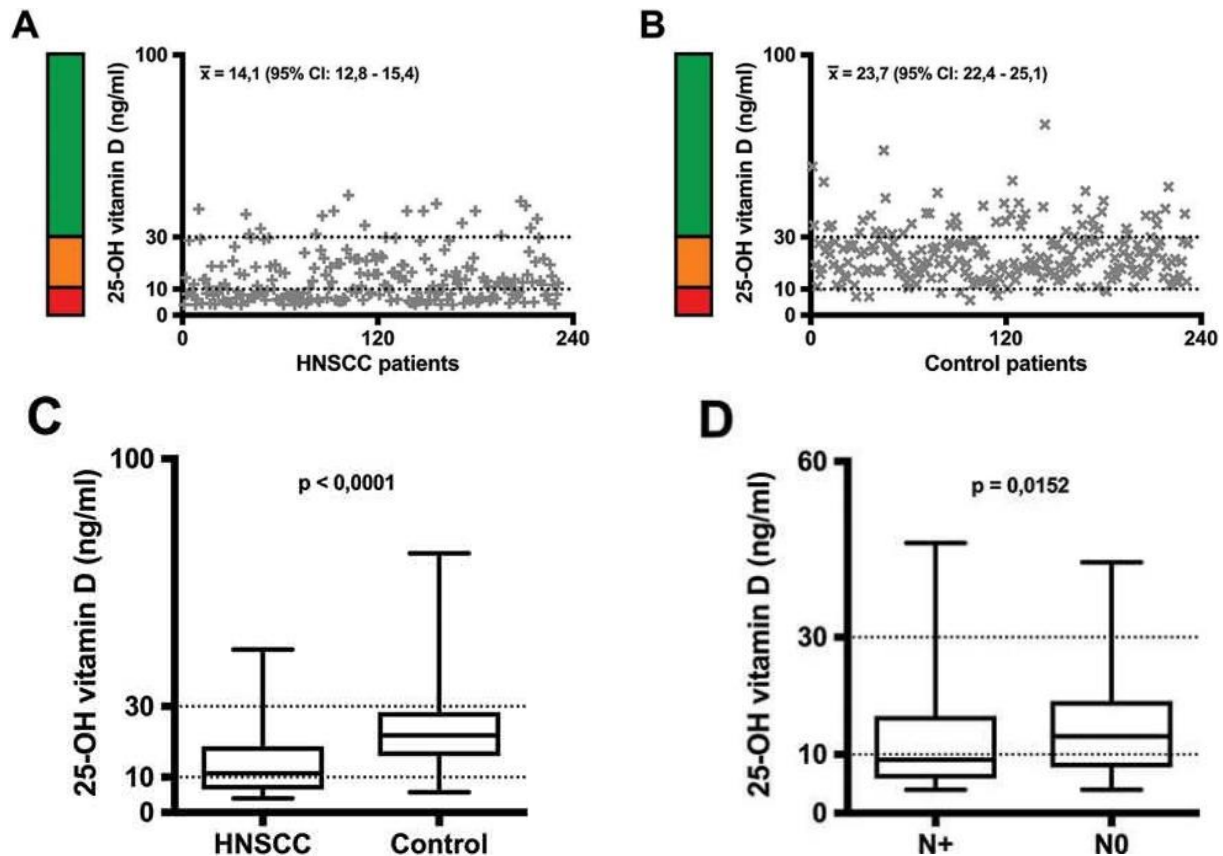


Abbildung 4: In **A** sind die Vitamin-D-Serumspiegel der HNSCC-Patienten ($x=14,1$) und in **B** die Vitamin-D-Serumspiegel der Kontrollpatienten ($x=23,7$) dargestellt. **C** bildet die in **A** und **B** für die beiden Gruppen dargestellten Daten in Boxplots ab, statistische Signifikanz: $p < 0,0001$. **D** veranschaulicht die Unterschiede im Befall der Lymphknoten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel mithilfe von Boxplots, statistische Signifikanz: $p = 0,0152$ (Bochen *et al.*, 2018).

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass ein ausreichender 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel zu einer vermehrten peri- und intratumoralen Immunzellinfiltration in Kopf-Hals-Tumoren führt, wohingegen ein Vitamin-D-Mangel mit einer verminderten Granzym B-Expression assoziiert ist (Yuzepolskiy *et al.*, 2014; Bochen *et al.*, 2018).

Des Weiteren konnten experimentelle Studien die angiogenesehemmende und antiproliferative Wirkung des Vitamin-D, sowie seine potenzierende Wirkung auf einige Chemotherapeutika in Tumorzelllinien bestätigen (Mantell *et al.*, 2000; Bernardi *et al.*, 2002; Hershberger *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2008). Auch bei Hamstern konnte bereits die klinische Wirksamkeit einer Vitamin-D-Therapie in der Behandlung bukkaler Beuteltumoren belegt werden (Meier *et al.*, 2007). Ein deutlich positiver Einfluss eines

ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegels auf das Gesamtüberleben von Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung konnte zudem in einer großen Metaanalyse nachgewiesen werden (Vaughan-Shaw *et al.*, 2017; Bochen *et al.*, 2018).

Darüber hinaus haben viele verschiedene Studien einen großen Einfluss von Vitamin-D auf das Immunsystem festgestellt (Mora *et al.*, 2008; Baeke *et al.*, 2010; Prietl *et al.*, 2013; Kongsbak *et al.*, 2014). So konnte einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel eine protektive Wirkung bei Patienten mit Tuberkulose, Multipler Sklerose und insulin-abhängigen Diabetes mellitus nachgewiesen werden (Zella *et al.*, 2003; Nnoaham and Clarke, 2008; Simpson *et al.*, 2010). Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) wird sowohl auf Makrophagen und dendritischen Zellen, als auch auf Lymphozyten exprimiert, die damit in ihrem Reifungsprozess auf Vitamin-D angewiesen sind (Toubi and Shoenfeld, 2010). Hierbei führt eine Vitamin-D-Exposition zu einem toleranteren Immunstatus durch die Minimierung proinflammatorischer Einflüsse. Aktives Vitamin-D wirkt dabei direkt auf die T-Zellen, wodurch diese die Sekretion von IL-2, INF- γ und TNF- α reduzieren und die Produktion von antientzündlichen Zytokinen wie IL-4 und IL-5 steigern. Durch Calcitriol aktivierte dendritische Zellen verändern ebenfalls ihre Zytokin-Expression, wodurch weniger inflammatorische Mediatoren wie IL-12 und deutlich mehr entzündungshemmende Mediatoren wie IL-10 ausgeschüttet werden (Boonstra *et al.*, 2001; Prietl *et al.*, 2013). Diese veränderte Zytokin-Expression wirkt so antiproliferativ auf TH1- und TH17-Zellen, während CD4⁺ regulatorische T-Zellen gleichzeitig aktiviert werden. Zudem kommt es zu einer gesteigerten Genexpression der regulatorischen T-Zellen (TREGs), die die proinflammatorische Wirkung anderer Immunzellen unterdrücken und so eine überschießende Immunreaktion verhindern (Baeke *et al.*, 2010).

Eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung scheint aber auch besonders wichtig für ein funktionsfähiges Immunsystem im Rahmen der Anti-Tumor-Immunreaktion zu sein (Walker *et al.*, 2012; Young and Day, 2013a). Die Entstehung eines Tumors hängt davon ab, ob das humane Immunsystem die Tumorzelle als entartete Zelle erkennen und zerstören kann, bevor es zu einer unkontrollierten Proliferation kommt. Tumorzellen können hierbei durch ihr modifiziertes Antigenespektrum in Form von tumorassoziierten und tumorspezifischen Antigenen von Immunzellen als entartet erkannt und in einer zytotoxischen Immunreaktion bekämpft werden (Ferris, 2015; Mandal *et al.*, 2016). Viele Tumorzellen versuchen dieser Erkennung und Bekämpfung durch die T-Zellen zu entgehen, indem sie eigene Moleküle, wie insbesondere die MHC-I-Moleküle, runterregulieren. Dieses „missing-self“-Phänomen wird allerdings von den NK-Zellen erkannt und aktiviert diese (Rink *et al.*, 2015). Zudem können Tumoren, die über längere Zeit durch das Immunsystem an einer Expansion gehindert wurden, durch Selektionsprozesse der Überwachung durch das Immunsystem entgehen und so unkontrolliert wachsen. Dieser Prozess wird als Immun-Editing bezeichnet (Mittal *et al.*, 2014; Rink *et al.*, 2015). Insbesondere Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, als immunsuppressive Tumorentität, zeichnen sich dabei durch eine eingeschränkte NK-Zell-Funktion, eine verminderte Aktivität tumorinfiltrierender Lymphozyten und Defekte in der Ausreifung dendritischer Zellen aus (Bauernhofer *et al.*, 2003;

Dasgupta *et al.*, 2005; Mandal *et al.*, 2016). Darüber hinaus bildet der Tumor ein immunsuppressives Milieu, welches durch die Produktion immunsuppressiver Mediatoren durch die HNSCC-Zellen entsteht und die Immunzellaktivität hemmt sowie den Progress der Tumorausbreitung fördert (Dasgupta *et al.*, 2005).

Nachdem die angegebenen Daten die positiven immunmodulatorischen Fähigkeiten des Vitamin-D in Gesunden, sowie Tumorpatienten veranschaulichen konnten (Bouillon *et al.*, 2008; Prietl *et al.*, 2013; Kongsbak *et al.*, 2014; Anand *et al.*, 2017), stellt sich nun die Frage, inwieweit Vitamin-D das körpereigene Immunsystem auch bei der effektiven Tumorbekämpfung unterstützen kann.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren besteht seit vielen Jahren aus der Kombination von chirurgischer Tumoresektion mit Chemo- und Strahlentherapie. Trotz der Zulassung des ersten therapeutischen Anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab im Jahre 2006 und weiteren Neuerungen und Verbesserungen in der Strahlen- und Chemotherapie, konnte die bis heute ungünstige Prognose und die reduzierten Überlebensraten der HNSCC-Patienten nicht wesentlich verbessert werden. Es kam dagegen sogar zu einer Zunahme der therapeutischen Toxizität und der Nebenwirkungen (Ramos *et al.*, 2010; Schmoll *et al.*, 2013). Inwieweit die Therapie mit den kürzlich zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab (Wollenberg, 2019) das Gesamtüberleben der Patienten in Zukunft verbessern und die Toxizität der Therapie reduzieren kann, bleibt abzuwarten. Aus diesem Grund muss die wissenschaftliche Forschung nach neuen prognoseverbessernden Therapiekonzepten suchen, die zudem ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen.

Ein vielversprechender Ansatz könnte hierbei die Herstellung eines ausreichend funktionsfähigen körpereigenen Immunsystems mithilfe von Vitamin-D sein, welches sich möglichst effektiv gegen den Tumor richten und so die Tumorprogression verhindern kann. Daneben sollte auch die protektive Wirkung des Vitamin-D in der Phase der Tumorentstehung untersucht werden, um den Tumor so bereits in den ersten Schritten seiner Genese an einem ausgeprägten Wachstum zu hindern. Die bei den meisten der Kopf-Hals-Tumorpatienten bestehende, ausgeprägte Immunschwäche stellt sich in diesem Zusammenhang allerdings als problematisch dar, da diese unter anderem dazu führt, dass die klinische Prognose und das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten reduziert ist (López-Albaitero *et al.*, 2006; Bergmann *et al.*, 2008; Wild *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2011). Auffällig ist hierbei, dass Kopf-Hals-Tumorpatienten häufig auch an einem prognostisch ungünstigen Vitamin-D-Mangel leiden, der aufgrund der immunregulatorischen und antikanzerogenen Funktionen des Vitamin-D zu einer verminderten antitumoralen Immunreaktion führt (Walker *et al.*, 2012; Bochen *et al.*, 2018).

Insgesamt geht der Weg in der Behandlung maligner Tumorerkrankungen tendenziell von einer allgemeinen Chemotherapie hin zu einer gezielten Therapie mit therapeutischen Antikörpern, Checkpoint- oder Tyrosinkinase-Inhibitoren. Hierbei könnte Vitamin-D eine entscheidende Rolle als supportiver Faktor in der Optimierung dieser Therapien spielen. So konnte die effizienzverbessernde Wirkung einer Vitamin-D-Substitution auf die Rituximab-Therapie bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) bereits in einer Studie nachgewiesen werden (Bittenbring *et al.*, 2014). Da die genaue Wirkung des Vitamin-D auf die tumorspezifische Immunabwehr aber noch nicht endgültig geklärt werden konnte, ist es für die Weiterentwicklung und Optimierung der immunmodulatorischen Therapien von großer Bedeutung, die Wirkungsweisen und Angriffspunkte des Vitamin-D weiter zu erforschen. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwieweit Vitamin-D auch die Aktivität der tumorspezifischen Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches beeinflussen kann.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin den Einfluss von Vitamin-D auf die lytische Signatur der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zu untersuchen. Die Expression der lytischen Enzyme Granulysin, Granzym A, Granzym B, Granzym K und Perforin in den zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen des intra- und peritumoralen Stromas von HNSCC-Patienten wurde dabei betrachtet. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen an Tumorgewebeproben eines Kollektivs von 114 HNSCC-Patienten, von denen 53 Patienten eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung mit einem Serumspiegel über 15 ng/ml und 61 Patienten einen Vitamin-D-Mangel mit einem Serumspiegel unter 10 ng/ml aufwiesen, durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen der jeweiligen Antikörper wurden mittels eines standardisierten immunreaktiven Scores von mehreren Personen bewertet und anschließend statistisch ausgewertet. Darüber hinaus wurden Korrelationen zwischen der Vitamin-D-Versorgung sowie dem Ausmaß der Expression der einzelnen lytischen Effekormoleküle und dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht, um so eine Aussage über den Einfluss auf die Prognose der Patienten treffen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Herstellernachweis

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellernachweis

Hersteller	Beschreibung
Abimed, Düsseldorf	Gilson-Pipetten
B. Braun, Melsungen	Aqua dest.
Carl Zeiss AG, Oberkochen	Durchlichtmikroskop, 4316184
Dako GmbH, Glostrup, Dänemark	REAL™DetectionSystemAlkaline Phosphatase/RED
Exquisit, Kaarst	Mikrowelle, MW 802 Si
Heraeus Instruments, Osterode	Tischzentrifuge (Biofuge pico)
IKA, Staufen i. Breisgau	Magnetrührer C-MAG HS 7
IKA, Staufen i. Breisgau	Vortex-Mixer (IKA-VIBRO-FIX)
Integra Biosciences, Biebertal	Pipetboy acu
Leica Microsystems, Wetzlar	Rotationsmikrotom SM2400; Rotationsmikrotom RM2125RT
MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg	Wärmeschrank, Incucell
Medax Nagel GmbH, Kiel	Wasserbad, Medax Typ WB24
Merck, Darmstadt	Entellan, Art. 1.07961.0500
R. Langenbrick GmbH, Emmendingen	SuperFrost Plus Objektträger
R. Langenbrick GmbH, Emmendingen	Deckgläser
Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen	Reagens-Transfer-Prozessor, Tissue-Tek®VIP™5
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP 61, BP 4100
Schleicher und Schüll, Dassel	Filterpapier, DE81
Tefal S.A.S, Rumilly, Frankreich	Classic 2 Reiskocher
Thermo Shadon GmbH, Frankfurt am Main	Einbettungsgerät, Histocentre2
WTW, Weilheim	pH-Meter, pH 197

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Herstellernachweis

Chemikalie	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Art. K45-001
EDTA (Tetraethylendiaminoessigsäure)	Merck, Darmstadt; Art. 324503
Entellan	Merck, Darmstadt; Art. 1.07961.0500
Ethanol, 100%	Merck, Darmstadt; Art. 8187601000
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Art. MHS32-1L
HCL	Merck, Darmstadt; Art. 109057
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt; Art. 106467
PBS pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 10010023
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Art. 061M5400V
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Art. 39796
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Art. 09208831

3.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
1 M Tris-Lösung	12,11 g Tris-Base 100 ml Aqua dest
0,5 M EDTA-Lösung; pH 8,0	93,06 g EDTA 300 ml Aqua dest
Tris-EDTA Retrievalpuffer; pH 9,0	296,4 ml Aqua dest 3,0 ml 1 M Tris-Lösung 600 µl 0,5 M EDTA-Lösung
5% BSA in PBS (pH 7,2)	200ml PBS 10 g BSA
3% BSA in PBS (pH 7,2)	200 ml PBS 6 g BSA
1% BSA in PBS (pH 7,2)	200 ml PBS 2 g BSA

3.1.4 Primärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper mit Hersteller- und Verdünnungsangaben

Antikörper	Herkunft	Beschreibung	Verdünnung (IHC)
Anti Granulysin	Abcam, England; Art. ab204594;	Polyklonaler Peptidantikörper Kaninchen	1:550
Anti Granzym A	Abcam, England; Art. ab209205;	Monoklonaler Peptidantikörper Kaninchen; Clone EPR20161	1:200
Anti Granzym B	Abcam, England; Art. ab4059;	Polyklonaler Peptidantikörper Kaninchen	1:1000
Anti Granzym K	Abcam, England; Art. ab3771;	Monoklonaler Peptidantikörper Maus; Clone GM-24C3	1:100
Anti Perforin	Abcam, England; Art. ab89821;	Monoklonaler Peptidantikörper Maus; Clone 5B10	1:25

3.2 Immunhistochemische Analysen

3.2.1 Fixierung des Gewebes

Die Gewebeproben der Primärtumoren wurden nach ihrer Entnahme in einem PBS-gepufferten, 4%igen Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Dieser Prozess erfolgte für die zur Etablierung und zur Negativkontrolle genutzten Gewebeproben, wie in Tabelle 5 dargestellt, automatisiert mithilfe des Reagenz-Transfer-Prozessors Tissue-Tek®VIP™5JR. Die Primärtumoren des untersuchten Patientenkollektivs wurden im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes fixiert und ebenfalls in Paraffin eingebettet.

Tabelle 5: Darstellung des Reagenz-Transferprozesses zur Fixierung des Gewebes

Reagenz	Temperatur (C°)	Dauer (h)
4%iges Formalin	45	2,0
70%iges Ethanol	40	0,5
70%iges Ethanol	40	1,0
70%iges Ethanol	40	1,0
96%iges Ethanol	40	0,5
99%iges Ethanol	40	1,0
99%iges Ethanol	40	1,0
Xylol	40	1,0
Xylol	40	1,0
Xylol	40	1,0
Paraffin	60	0,5
Paraffin	60	0,5
Paraffin	60	1,0
Paraffin	60	1,0

Die in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden anschließend mithilfe des Leica RM 2235 Rotationsmikrotoms geschnitten. Dabei wurden zunächst drei, je 10 µm dicke Schnitte verworfen, um dann Schnitte von 4 µm Dicke anzufertigen. Die 4-µm-Schnitte wurden anschließend in ein 37°C warmes Wasserbad überführt um eine gleichmäßige Streckung der Schnitte zu ermöglichen, bevor sie auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht trocknen gelassen wurden. Um eine optimale Haftung auf den Objektträgern sicherzustellen, wurden sie am Tag vor der immunhistochemischen Färbung bei 37°C für 24 Stunden im Wärmeschrank gelagert.

3.2.2 Etablierung

Zur immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte der FFPE-Proben der 114 HNSCC-Patienten wurde ein im Forschungslabor der HNO-Klinik etabliertes Grundlagenprotokoll von Florian Bochen, M.Sc. (Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universität des Saarlandes) verwendet, welches bereits in einigen vorherigen Versuchen ein gutes Färbeergebnis lieferte. Das Protokoll wurde dabei zunächst an die in dieser Arbeit verwendeten Präparate und Antikörper angepasst, um spezifische Färbesignale garantieren zu können. Zudem wurden bei jeder immunhistochemischen Färbung sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle eines bekannten Tonsillen- oder HNSCC-Präparats zur Überprüfung des Färbeergebnisses mitgefärbt.

Die Anpassung des Protokolls erfolgte zu Beginn an Tonsillen, um die lytischen Enzyme in möglichst vielen unterschiedlichen Immunzellen darstellen zu können. Im nächsten Schritt wurden Tumorproben von HNSCC-Patienten aus dem Bestand des Forschungslabors der HNO verwendet, die aber nicht dem Kollektiv der Arbeit angehörten, um die Übertragung des Protokolls vom Etablierungsmaterial auf das Material des Patientenkollektivs zu erleichtern.

Probleme traten dabei im ersten Schritt vor allem durch eine deutliche unspezifische Färbung des Hintergrundes auf, die kaum von der Antikörper-spezifischen Färbung zu unterscheiden war. In anderen Fällen kam es dagegen teilweise zu keiner Färbereaktion oder die Färbung war sehr schwach ausgeprägt. In einigen vorherigen Versuchen zeigte sich, dass ein Demaskierungsvorgang mit einem Retrieval-Puffer mit einem pH 9,0 tendenziell zu einer besseren Differenzierung zwischen unspezifischem Hintergrund und spezifischer Antikörperfärbung führt, als ein Demaskierungsvorgang mit einem pH 6,0-Citrat-Retrievalpuffer. Aus diesem Grund wurde der pH 9,0-Tris-EDTA-Retrieval-Puffer verwendet und im nächsten Schritt die Demaskierungszeit im Retrieval-Puffer angepasst. Die ursprüngliche Demaskierungszeit von 20 Minuten wurde dabei schrittweise reduziert bis ein bestmögliches Färbeergebnis erzielt wurde (Abb. 5). Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Antikörper sehr unterschiedliche Demaskierungszeiten benötigten, um möglichst wenige unspezifische Reaktionen und dennoch ein ausreichendes spezifisches Signal zu erzeugen. So erzielte Granzym B sein bestes Färbeergebnis bereits nach nur 10,5 Minuten Demaskierungszeit, während bei Granzym K 13 Minuten, bei Granulysin 16 Minuten, bei Granzym A 17 Minuten und bei Perforin 20 Minuten nötig waren.

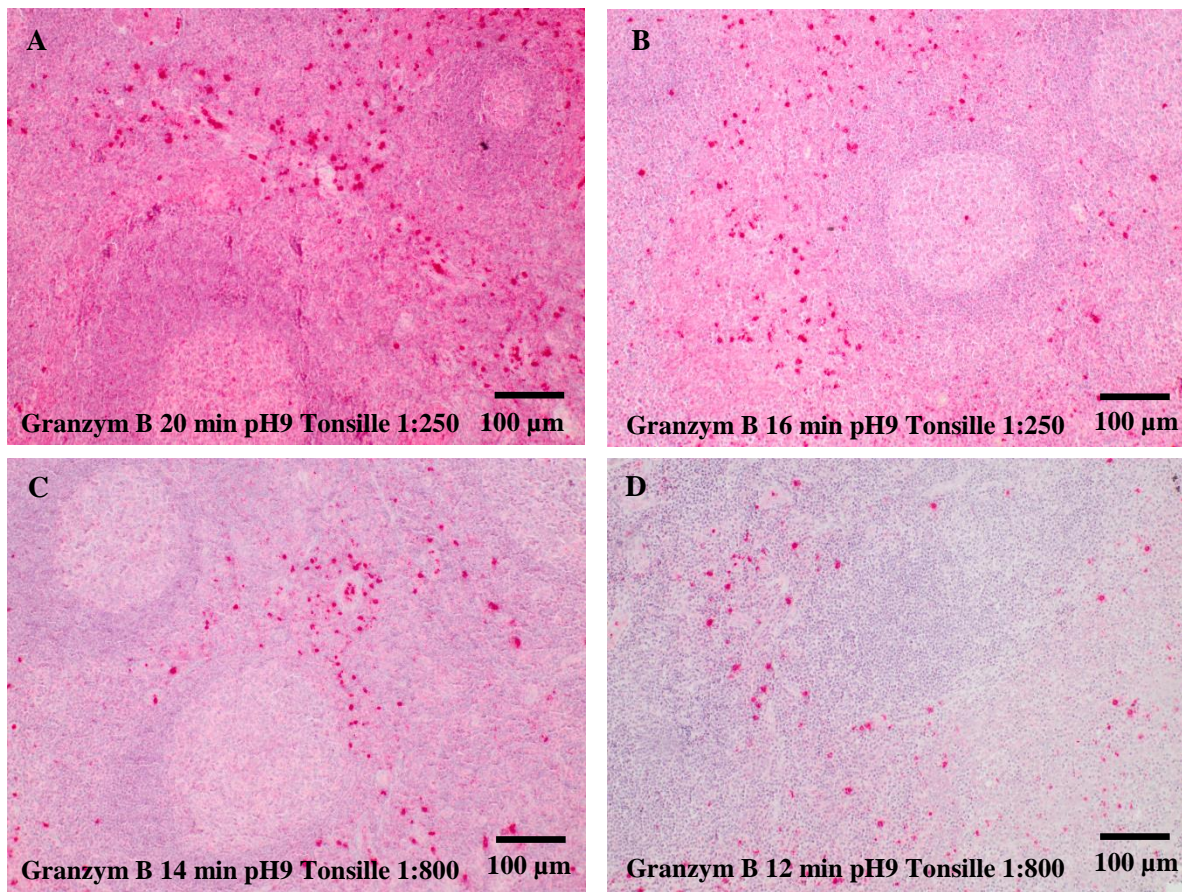


Abbildung 5: Darstellung der Etablierung von Granzym B mit unterschiedlichen Demaskierungszeiten und Antikörperkonzentrationen: Die Bilder **A** und **B** zeigen Versuche mit einer Antikörperkonzentration von 1:250 und unterschiedlichen Demaskierungszeiten, die Bilder **C** und **D** stellen Versuche mit einer Antikörperkonzentration von 1:800 und ebenfalls unterschiedlichen Demaskierungszeiten dar.

Schließlich mussten die Antikörperkonzentrationen angepasst werden, um ein möglichst deutliches spezifisches Signal zu erhalten, welches weder in einer verminderten, noch in einer überschießenden Färbereaktion resultierte. Dabei wurden als Grundkonzentrationen die Angaben des Antikörperherstellers Abcam berücksichtigt. Es zeigte sich, dass die meisten Antikörper deutlich stärker als angegeben verdünnt werden konnten, was bei Granzym B zu einer Verdünnung von 1:1000, bei Granulysin von 1:550, bei Granzym A von 1:200, bei Granzym K von 1:100 und bei Perforin von 1:25 führte. In Abbildung 6 ist die Anpassung der Konzentration des gegen Granzym K gerichteten Antikörpers von 1:50 bis 1:100 mit unterschiedlichen Demaskierungszeiten exemplarisch dargestellt.

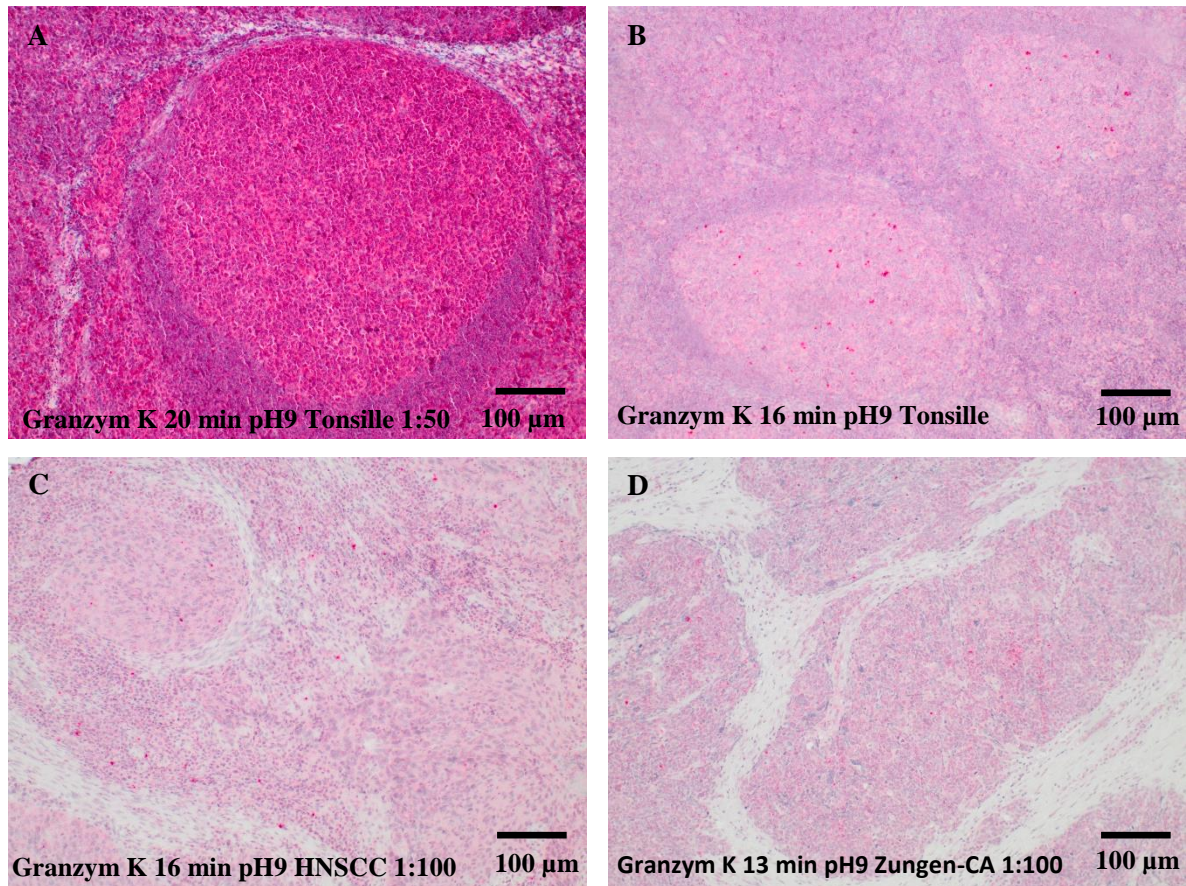


Abbildung 6: Darstellung einer Etablierungsreihe exemplarisch für den Antikörper Granzym K: Bild A zeigt den ersten Etablierungsversuch mit einer Demaskierungszeit von 20 min, einem pH-9-Puffer und einer Antikörperverdünnung von 1:50. Die Bilder B und C stellen die Anpassung an einer Tonsille und einem HNO-internen HNSCC-Präparat dar, während Bild D das Endergebnis mit einer Desmaskierungszeit von 13 min und einer Antikörperverdünnung von 1:100 an einem Zungenkarzinom zeigt.

Bei Perforin trat zudem das Problem auf, dass sich die äußersten Epithelschichten deutlich mitanfärbten. Diese Kreuzreaktion mit differenzierten Epithelien ist allerdings bereits in einigen anderen Arbeiten, die denselben Antikörperklon nutzten, beschrieben (Leica Biosystems, 2014) und wurde in der Auswertung berücksichtigt, da dieser Antikörper, trotz des beschriebenen Problems, der am besten geeignete für immunhistochemische Färbungen ist. Um dennoch die möglichst spezifische Färbung des Enzyms Perforin zu optimieren, wurde das Detergens Tween 20 in den Waschschritten sowie zur Antikörperlösung hinzugefügt, um unspezifische Bindungen zu verringern. Dadurch konnten die unspezifischen Färbereaktionen minimiert werden, ohne dass die Intensität der spezifischen Antikörpersignale eingeschränkt wurde. In Abbildung 7 ist die Etablierungsreihe mit den entsprechenden Anpassungen für den Perforin-Antikörper exemplarisch dargestellt.

Im letzten Schritt wurde dann, nach erfolgreicher Etablierung der Versuchsprotokolle, mit der Färbung der Gewebeproben des Patientenkollektivs begonnen.

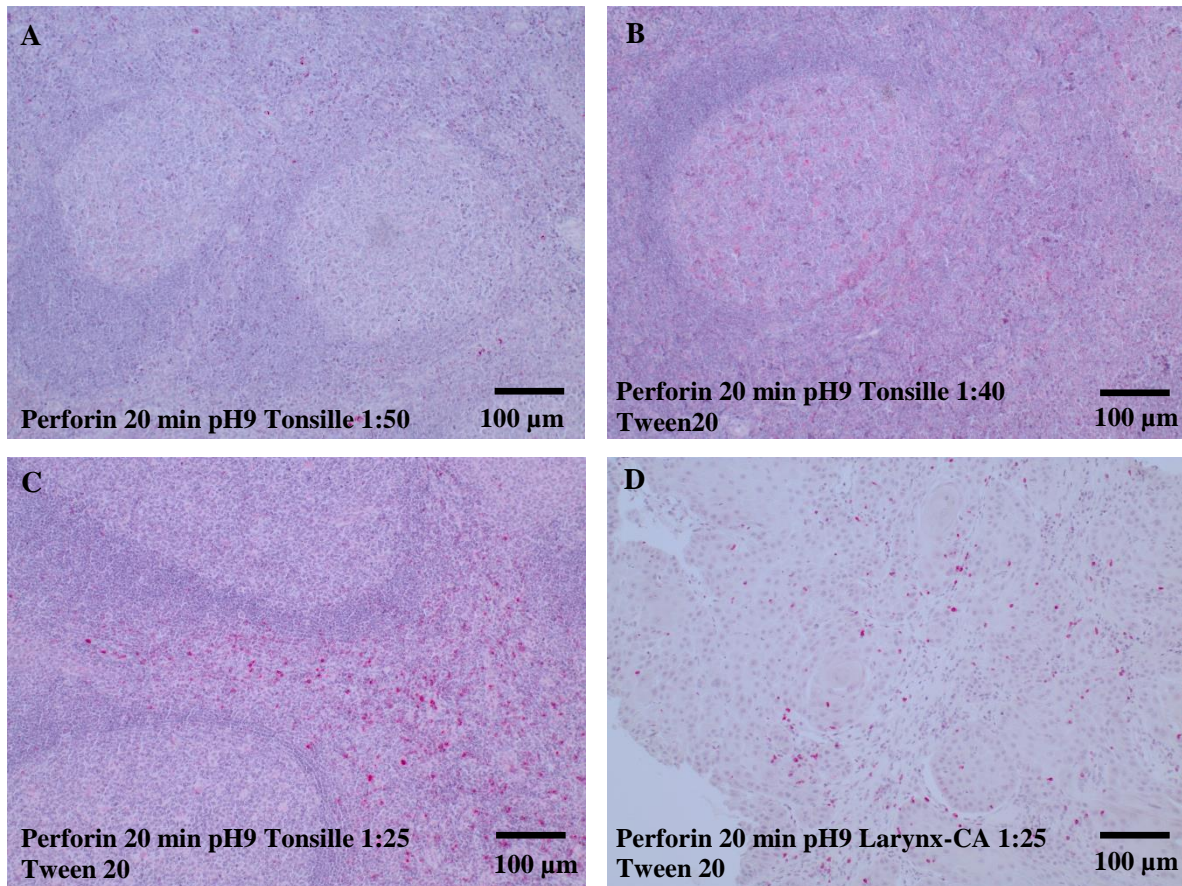


Abbildung 7: Darstellung einer Etablierungsreihe exemplarisch für den Antikörper Perforin: Bild A zeigt den ersten Etablierungsversuch mit einer Demaskierungszeit von 20 min, einem pH-9-Puffer und einer Antikörperverdünnung von 1:50. Die Bilder B und C stellen die Anpassung der Antikörperkonzentrationen mit 1:40 und 1:25 unter Verwendung des Detergens Tween 20 dar, während Bild D das Endergebnis mit einer Demaskierungszeit von 20 min und einer Antikörperverdünnung von 1:25 an einem Larynxkarzinom zeigt.

3.2.3 Versuchsablauf

Zur optimalen Fixierung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden diese über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte 10 min in einer absteigenden Xylol-Reihe entparaffiniert, anschließend durch je dreimaliges Schwenken in 100%igem und 70%igem Alkohol auf ein wässriges Milieu vorbereitet und schließlich in Aqua dest. gewaschen. Die darauf folgende Demaskierung in Tris-EDTA-Retrivallpuffer mit einem pH 9,0 erfolgte bei > 95 °C je nach Antikörper für 10,5 Minuten, 13 Minuten, 16 Minuten, 17 Minuten oder 20 Minuten.

Nachdem die Gewebeschnitte dann auf eine Temperatur unter 50° C abgekühlt und drei mal fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen wurden, folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 3% BSA-PBS-Lösung.

Anschließend wurden die Präparate mit den Primärantikörpern (Granulysin, Granzym A, Granzym B, Granzym K und Perforin) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies erfolgte in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

Nach einem weiteren 3 mal 5-minütigen Waschvorgang in PBS-Puffer, wurden die Präparate 30 min mit dem Sekundäntikörper des Dako REAL Detection Systems inkubiert. Darauf folgte, nach erneuter 3 mal 5-minütiger Waschung in PBS, die 30-minütige Inkubation mit dem Tertiäntikörper des Detektionssystems. Schließlich wurden die Präparate erneut gewaschen und durch 15-minütige Inkubation mit Chromogen-Substrat zur Farbreaktion gebracht.

Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, 10 min fließend gewässert und einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe zugeführt, um sie abschließend mit Entellan einzudecken.

Tabelle 6: Systematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Durchgeführte Maßnahme	Zeitangabe
Fixierung im Wärmeschrank 37 °C	24 h
Entparaffinieren in Xylol	3 x 5 min
100 % Alkohol	3 x 30 sec
70 % Alkohol	3 x 30 sec
Aqua dest	2 x 60 sec
Demaskierung durch Kochen in Retrievalpuffer	10,5 min/ 13 min/ 16 min / 17min/ 20 min
Abkühlen unter 50 °C	30 min
Waschen in PBS-Puffer	3 x 5 min
Inkubation mit 3 % BSA	30 min
Inkubation des Primäntikörpers bei 20°C	1 h
Waschen in PBS-Puffer	3 x 5 min
Inkubation des Sekundäntikörpers	30 min
Waschen in PBS-Puffer	3 x 5 min
Inkubation des Tertiäntikörpers	30 min
Waschen in PBS-Puffer	3 x 5 min
Inkubation der Chromogen-Lösung	15 min
Aqua dest	5 min
Färben in Hämatoxylin	7 min
Fließend wässern	15 min
70 % Alkohol	3 x 30 sec
100 % Alkohol	3 x 30 sec
Xylol	3 x 30 sec
Eindecken mit Entellan	

3.2.4 Semiquantitative Auswertung der IHC

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgte am Durchlichtmikroskop durch zwei verschiedene, bezüglich der Bewertung des anderen Auswerters, sowie der histologischen Diagnose des zu beurteilenden Präparates verblindete Personen.

Zur semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde ein immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987) genutzt, der ursprünglich für den Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf der Oberfläche von Mammakarziomzellen entwickelt wurde. Die Bewertungsskala setzt sich dabei aus der antikörperspezifischen Färbeintensität und der Anzahl positiver Zellen im Verhältnis zur analysierten Gesamtzellpopulation zusammen. Die Färbeintensität wurde in 0,5er Schritten von 0 bis 3 (0 – keine Reaktion, 1 – schwache Reaktion, 2 – mäßige Reaktion, 3- starke Reaktion) eingeteilt, um so ihr spezifische Einteilung sowohl bezüglich der verschiedenen Antikörper als auch der unterschiedlichen Präparate gewährleisten zu können. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen konnte Werte von 0 bis 4 annehmen. Dabei verkörperte der Wert 0 keine positiven Zellen, der Wert 1 bis zu 10% positive Zellen, der Wert 2 einen Anteil von 10 bis 50% positiver Zellen, der Wert 3 einen Anteil von 51 bis 80% positiver Zellen und der Wert 4 über 80% positive Zellen. Das entstehende Produkt aus Färbeintensität (0-3) und Anzahl positiver Zellen (0-4) ergab so den Immunreaktiven Score (IRS) mit Werten von 0 bis 12.

Um in dem jeweiligen Präparat zwischen der Expression der lytischen Enzyme durch die Leukozyten im Tumor und dem umliegenden Stroma unterscheiden zu können, wurde der IRS sowohl für die Leukozyten im Tumor, als auch für die Leukozyten der peritumoralen Umgebung erhoben. Da vor allem bei Granulysin, Granzym K und Perforin auch eine spezifische Färbung der Tumorzellen selbst deutlich wurde, wurde bei diesen Antikörpern zudem der IRS für den Tumoranteil der Präparate ermittelt.

3.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurde die Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Zunächst wurden die Werte mithilfe des D'Agostino-&-Pearson-normality-Tests auf ihre Normalverteilung überprüft, um dann einen zweiseitigen Mann-Whitney-U Test durchzuführen. Die Analyse der Überlebensdaten der Patienten erfolgte mithilfe des log-rank-Tests nach Mantel und Cox. Bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wurden P-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3.4 Klassifikation und Differenzierung

Das TNM-System, als weltweit anerkanntes Klassifikationssystem für maligne Tumore, wurde 1950 erstmals von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) erstellt und wird seitdem regelmäßig aktualisiert (Wittekind and Oberschmid, 2010; Brierley *et al.*, 2017). Grundsätzlich unterscheidet man eine cTNM-Klassifikation, die auf der rein klinisch gestellten Diagnose beruht, von einer pathologisch gesicherten pTNM-Klassifikation. Das „T“ steht dabei für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, während das „N“ den Befall der Lymphknoten angibt und das „M“ die Fernmetastasierung beschreibt (Barnes *et al.*, 2010; Brierley *et al.*, 2017). Diese Klassifikation ist für die klinische Praxis von großer Bedeutung, da sie die genaue Beurteilung des Tumor- und Metastasierungszustandes bei Erstdiagnose ermöglicht und dadurch Hinweise zur Einschätzung der Prognose der Patienten und auch möglichen Therapieoptionen gibt.

Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle in den Jahren 2013 bis 2016 rekrutiert wurden, wurde hier noch die siebte Version des TNM-Klassifikationssystems aus dem Jahre 2010 genutzt. Dieses ist online einzusehen (<https://www.uicc.org/tnm-classification-malignanttumours-7th-edition>). Neben dieser TNM-Klassifikation gibt es noch eine weitere Klassifikation der UICC, die eine genaue klinische Stadieneinteilung in die Stadien 0 bis IVc vornimmt (Reiß *et al.*, 2009). Darüber hinaus lassen sich die Plattenepithelkarzinome histologisch nach ihrem Differenzierungsgrad einteilen. Diese Klassifizierung reicht von gut differenzierten Karzinomen mit wenigen Mitosen im Grad 1, über mäßig differenzierte Karzinome im Grad 2, zu den schlecht differenzierten Karzinomen mit vielen Mitosen im Grad 3. Der Differenzierungsgrad der Plattenepithelkarzinome lässt häufig auf die Malignität und die Aggressivität des Tumorwachstums schließen (Reiß *et al.*, 2009).

3.5 Anonymisiertes Patientenkollektiv

Diese Arbeit untersuchte Gewebeschnitte eines Kollektivs von 114 HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher Vitamin-D-Versorgung. Dabei gliederte sich das Kollektiv in 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml und 53 Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel über 15 ng/ml.

Das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie hatte bereits zuvor die Patientenproben untersucht und als Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs diagnostiziert.

Alle Patienten wurden im Vorfeld über die Nutzung ihres Gewebes für Forschungszwecke aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Ein Votum der Ethikkommission des Saarlandes (280/10) genehmigte die Versuche dieser Arbeit.

Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D Versorgung (n=53)

Geschlecht	Alter	Vitamin D[ng/ml]	Diagnose	TNM-Stadium	UICC
w	61	28,7	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM1 G3	4c
m	64	13,2	Tonsillen-CA	pT2 cN1 cM0 G3	3
m	61	40,8	Zungengrund-CA	pT1 pN2b cM0 G2	4a
m	84	18,8	Zungen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	4a
m	74	18,7	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G3	3
m	70	15,3	Zungen-CA	pT1 cN2b cM0 G2	4a
m	58	20,8	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cM0 G2	4a
m	60	26,3	Weichgaumen-CA	pT3 pN0 cM0 G2	3
m	57	12,6	Larynx-CA	pT3 pN2b cM0 G2	4a
m	48	18,5	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	2
m	73	16	Tonsillen-CA	cT3 pN2b cM0 G3	4a
m	63	14,4	Zungengrund-CA	cT3 pN3b cM0 G3	4b
w	72	35,4	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	3
w	82	15,5	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G2	1
m	54	38,8	Hypopharynx-CA	cT4 cN0 cM0 G3	4a
m	72	31,1	Zungen-CA	pT2 pN2bb cM0 G3	4a
m	60	29,6	Tonsillen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	4a
m	64	18,5	Zungengrund	rpT3 cN0 cM0 G3	3
w	79	33,3	Wangen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	2
w	48	29,1	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	3
w	33	18,7	Zungenrand-CA	pT2 pN1 cM0 G2	3
m	42	16,8	Zungengrund-CA	cT3 cN0 cM0 G2	3
m	66	16,2	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	3
m	51	24	Zungengrund-CA	cT2 pN2b cM0 G2	4a
m	60	18,1	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2c cM1 G2	4a
m	65	31,1	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	1
w	59	38,2	Zungen-CA	pT2 cN0 cM0 G3	2
m	65	21,8	Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G2	4a
m	61	19,8	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM1 G2	4c
m	63	10,8	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G3	3
m	72	19,7	Zungengrund-CA	cT2 pN2b cM0 G3	4a
m	56	25,2	Mundboden-CA	cT1 cN0 cM0 G2	1
m	52	11,9	Larynx-CA	pT2 pN0 cM0 G2	2
m	52	64,1	Mundboden-CA	cT2 pN2c cM0 G2	4a
m	78	22,1	Larynx-CA	pT1b cN0 cM0 G2	1
m	80	21,5	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G3	3

3. Material und Methoden

w	65	21,6	Tonsillen-CA	cT1 pN0 cM0 G3	1
m	82	16,1	Larynx-CA	cT3 pN1 cM0 G3	3
m	75	23,4	Tonsillen-, Zungengrund-CA	pT3 pN2c cM0 G3	4a
m	71	15,7	Zungenrand-CA	cT2 pN1 cM0 G3	3
m	80	21,1	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM0 G3	4a
w	54	15,8	Zungen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	2
m	79	17,5	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cM0 G3	4a
m	63	11,2	Tonsillen-CA	cT2 pN2b cM0 G3	4a
m	80	25,1	Zungengrund-CA	pT2 pN2b cM0 G3	4a
m	71	28,7	Tonsillen-CA	pT2 pN2b cM0 G2	4a
m	82	16,7	Mehretagen von Tonsillen-CA	cT4b cN2c cM0 G2	4a
w	47	22,8	Zungen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	1
w	63	22,1	Naso-, Oro-, Hypopharynx-CA	cT4 pN2c cM0 G2	4a
w	87	29,9	Tonsillen-CA	cT2 cN0 cM0 G2	2
m	60	16,4	Tonsillen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	1
m	73	16,6	Oro-, Hypopharynx, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	4a
w	58	16,5	Tonsillen-CA	cT4 pN2c cM0 G3	4a
m	66	19,4	Tonsillen-CA	cT2 pN1 cM0 G3	3

Patienten mit einem Vitamin D Mangel (n=61)

Geschlecht	Alter	Vitamin D [ng/ml]	Diagnose	TNM-Stadium	UICC
m	79	4	Tonsillen-CA	pT1 pN1 cM0 G3	3
m	70	4	Zungengrund-CA	cT3 cN2c cM0 G2	4a
m	60	4	Hypopharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	2
m	51	8,1	Tonsillen-CA	cT2 pN2b cM0 G3	4a
m	49	8,9	Zungengrund-CA	cT2 pN2b cM0 G3	4a
m	69	7,5	Tonsillen-CA	pT2 pN2c cM0 G2	4a
w	53	8,3	Tonsillen-CA	pT2 pN2c cM0 G3	4a
m	74	7,6	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	2
m	61	4,2	Larynx-CA	cT3 cN3 cM0 G2	4b
m	60	9,3	Larynx-CA	cT2 cN2b cM0 G1	2
m	57	8,4	Oropharynx-Zungengrund-Ca	rcT2 pN1 cM0 G2	2
m	68	5,6	Hyopharynx-, Larynx-CA	pT4a pN1 cM0 G2	4a
m	53	9,9	Hypopharynx-CA	pT2 pN2b cM0 G3	4a

3. Material und Methoden

w	67	4,8	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G3	4a
m	74	6,5	Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	1
m	78	4	Larynx-CA	cT3 cN2b cM0 G2	4a
m	73	7,8	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	4a
m	55	5,3	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	4b
m	59	7,8	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	4a
m	69	6,7	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G3	4a
m	71	9	Larynx-CA	pT2 pN2b cM0 G2	4a
m	64	8,8	Zungen-CA	cT2 cN0 cM0 G1	4a
m	67	5,8	Mundboden-CA	pT1 pN0 cM0 G2	2
m	42	6	Zungen-CA	cT3 cN0 cM0 G3	1
m	66	6,4	Zungen-CA	cT4b cN3 cM0 G2	4b
m	65	4	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	4a
w	78	8,1	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cM0 G3	4a
m	64	7	Larynx-CA	cT4 pN0 cM0 G2	4a
m	56	6,2	Zungengrund-CA	pT2 pN1 cM0 G2	3
m	63	8	Zungengrund-CA	pT1 pN2b pM1 G3	4c
m	53	4	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	4a
m	58	8	Zungengrund-CA	cT3 pN2b cM0 G3	4a
m	47	8	Tonsillen-CA	pT1 pN1 cM1 G2	3
m	64	4,9	Oropharynx-Ca	cT4a cN2c cM0 G3	4a
m	74	5,5	Oro-,Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4a pN0 cM0 G3	4a
m	65	8,5	Zungengrund-CA	cT4b cN3 cM1 G3	4c
m	56	4,5	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G3	2
w	56	5,6	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cMx G3	4c
m	50	5,9	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	3
m	59	5,3	Zungen-CA	cT3 cN1 cM1 G2	4c
m	87	< 4,0	Rachenhinterwand-CA	cT3cN1 cM0 G3	3
w	66	5,8	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	4b
w	58	5,4	Tonsillen-CA	cT4 pN2b cM0 G3	4a
m	59	5,4	Mundboden-CA	pT2 pN3 cM0 G2	4b
m	80	6,6	Larynx-CA	cT4 cN0 cM0 G2	4a
m	71	5,8	Oro-/Hypopharynx-CA	cT3 cN2c cM0 G3	4c
m	65	9,2	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G1	1
m	73	8,7	Oro-,Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	4a

3. Material und Methoden

m	57	5,8	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	1
m	57	5,3	Larynx-CA	cT2 pN0 cM0 G2	2
m	64	7,8	Larynx-CA	cT3 pN0 cM0 G2	3
m	60	8,2	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	3
m	57	9,1	Uvula-CA	pT2 pN2c cM0 G2	4a
m	71	5,5	Larynx-CA	pT2 cN2b cM0 G2	4a
m	55	5,4	Zungengrund-CA	pT1 pN2a cM0 G2	4a
m	48	6,1	Zungengrund-CA	pT3 pN0 cM0 G2	3
m	75	8,6	Hypopharynx-CA	cT2 pN0 cM0 G3	2
w	68	4,2	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	3
m	58	4,8	Hypopharynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4a
m	68	4,8	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G2	4a
m	76	6,8	Hypopharynx-CA	cT3 pN2 cM0 G3	4a
m	58	5,9	Mundboden-CA	cT2 pN0 cM0 G3	2
w	64	4	Oro-,Hypopharynx-, Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4a

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Das 114 HNSCC-Patienten beinhaltende Kollektiv, gliederte sich in 93 männliche und 21 weibliche Patienten. Das Durchschnittsalter der Frauen betrug 63 Jahre, während das der Männer 65 Jahre betrug. Bei allen im Kollektiv eingeschlossenen Patienten wurde ein Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches diagnostiziert, welches durch das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes bestätigt und klassifiziert wurde. Die Tumoren vertraten verschiedene Stadien, von einem pT1a cN0 cM0-Stadium bis zu einem cT4b cN3 cM1-Stadium. Von allen im Kollektiv eingeschlossenen Patienten war der HPV-Status bekannt. 93 Patienten hatten einen HPV-negativen Tumor, während 21 Patienten ein HPV-positives Karzinom aufwiesen. Zu der Bestimmung des HPV-Status bei HNSCC-Patienten gibt es bisher keine einheitliche Methode und auch ein zugelassener und zuverlässiger Abstrichtest existiert derzeit noch nicht. Der HPV-Status der Patienten des vorliegenden Kollektivs wurde deshalb gleichzeitig über den immunhistochemischen Nachweis des HPV-high-risk-assoziierten Biomarkers p16NK4a und des Proliferationsmarkers Ki67 mithilfe des CINtec PLUS-Kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), sowie den Nachweis von HPV-DNA mittels spezifischer PCR bestimmt (Linxweiler and Schick, 2015). Ein Tumor wurde dabei als HPV-positiv gewertet wenn sowohl das Ergebnis der PCR als auch das der Immunhistochemie positiv waren. Die Bestimmung des Vitamin-D-Serumspiegels der Patienten beider Kollektive erfolgte über das Jahr verteilt, zu gleichen Teilen in den Sommer- (April bis September, 52%) und Wintermonaten (Oktober bis März, 48%), um so den Einfluss der jahreszeitbedingt schwankenden Sonnenlichtexposition auf die Ergebnisse der Studie möglichst gering zu halten. Zudem wurde der Ernährungszustand der Tumorpatienten im Vorfeld analysiert; dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Body-Mass-Index der VDA- und VDM-Kollektive.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinome gliederten sich in Larynx-, Mundboden-, Tonsillen-, Zungengrund-, Zungen-, Hypopharynx-, Weichgaumen- und Wangenkarzinome. Das Larynxkarzinom war dabei mit 32 Fällen am häufigsten vertreten, gefolgt von dem Tonsillenkarzinom mit 26 Fällen und dem Zungengrundkarzinom mit 20 Fällen (Abb. 8).

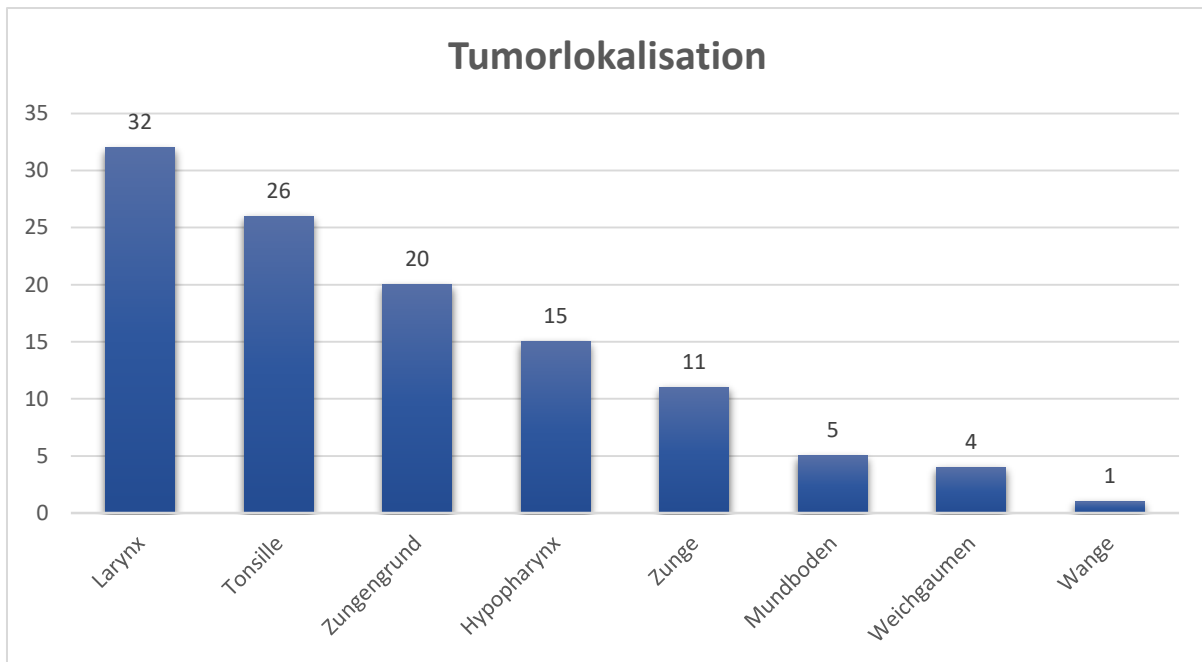


Abbildung 8: Statistische Auswertung der Tumorlokalisation des untersuchten Patientenkollektivs. Die Daten wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt. In absteigender Reihenfolge der Häufigkeit: Larynx- (n=32), Tonsillen- (n=26), Zungengrund- (n=20), Hypopharynx- (n=15), Zungen- (n=11), Mundboden- (n=5), Weichgaumen- (n=4) und Wangenkarzinom (n=1).

4.2 Charakterisierung der Präparate

4.2.1 Auswertung der T- und N-Stadien

Das Tumorstadium und das Staging haben einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose und die Wahl der am besten geeigneten Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Das Ausgangsstadium des Tumors zum Zeitpunkt der Operation sowie die Verlaufsbeurteilung des TNM-Stadiums sind dabei von großer Bedeutung, um den Therapieerfolg und den Verlauf der Tumorausdehnung definieren zu können. Dazu wurden die T- (Ausdehnung/Größe des Primärtumors) und N- (Befall der Lymphknoten) Stadien der untersuchten Karzinome ausgewertet und anhand des vorliegenden Vitamin-D-Serumspiegels miteinander verglichen (Abb. 9 und 10). So befanden sich im gesamten Kollektiv 17 Tumore im Stadium T1, 47 Tumore im Stadium T2, 26 Tumore im Stadium T3 und 24 Tumore im Stadium T4. Im Kollektiv der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung machten die Karzinome im Stadium T1 einen prozentualen Anteil von 17,0 % aus, die Karzinome im Stadium T2 von 43,3 %, die Karzinome im Stadium T3 von 24,5 % und die Karzinome im Stadium T4 von 15,1 % aus. Im Kollektiv der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel dagegen waren T1-Tumore zu 13,1 %, T2-Tumore zu 39,9 %, T3-Tumore zu 21,3 % und T4-Tumore zu 26,3 % vertreten (Abb. 9).

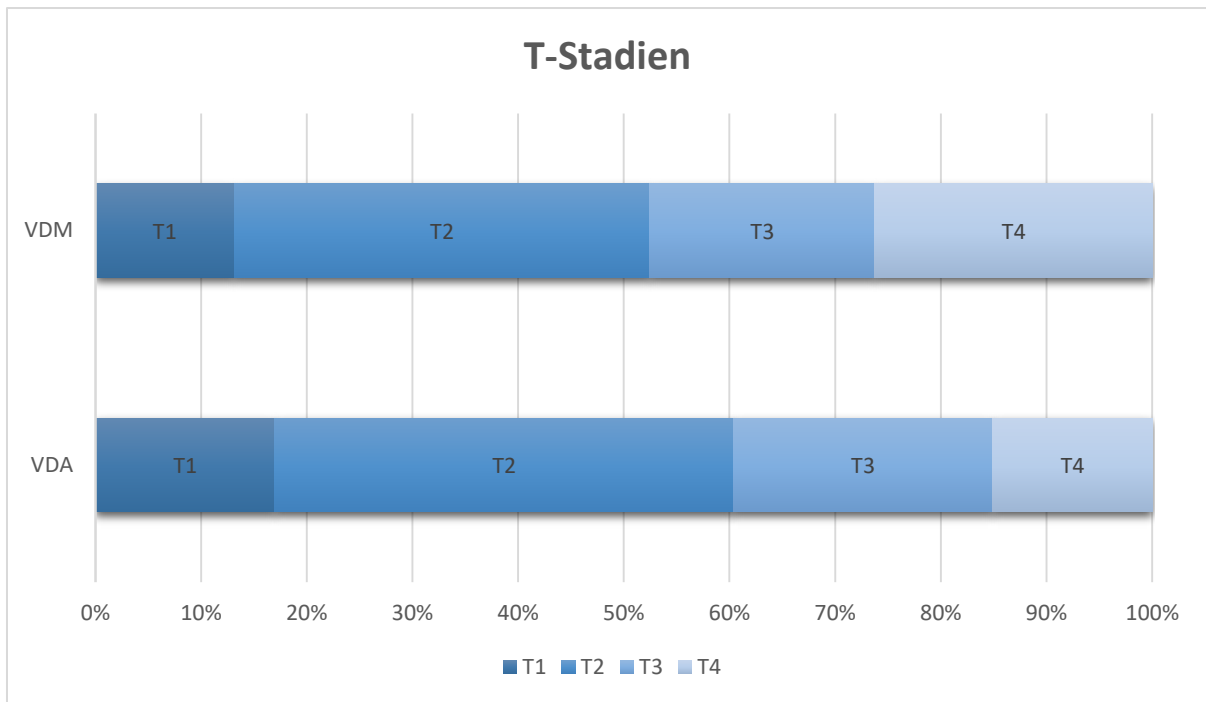


Abbildung 9: Statistische Auswertung der T-Stadien der untersuchten Patientenkollektive. Die Daten wurden in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel ausgewertet und in Balkendiagrammen dargestellt. Jeder Balken repräsentiert die prozentuale Verteilung der T-Stadien. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) mit dem Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM).

Bei der Betrachtung der Lymphknotenmetastasen zeigten sich im gesamten Kollektiv 36 Tumore im Stadium N0, also ohne Nachweis einer Metastasierung in die Lymphknoten, 17 Tumore im Stadium N1, 54 Tumore im Stadium N2 und 7 Tumore im Stadium N3. Im Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung war das Stadium N0 zu 35,8 %, das Stadium N1 zu 17,0 %, das Stadium N2 zu 45,3 % und das Stadium N3 zu lediglich 1,9 % vertreten. Bei den Patienten mit Vitamin-D-Mangel zeigten sich dagegen lediglich 27,9 % der Tumore im Stadium N0, während sich 13,1 % der Tumore im Stadium N1, 29,2 % im Stadium N2 und 9,8 % im Stadium N3 befanden (Abb. 10). Insgesamt war also eine schwächere Tendenz hin zu höheren T- sowie N-Stadien bei den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel zu erkennen. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten ihre Erstdiagnose in den Jahren 2013 bis 2016 erhielten, wurde in der Auswertung noch die siebte Version der TNM-Klassifikation genutzt.

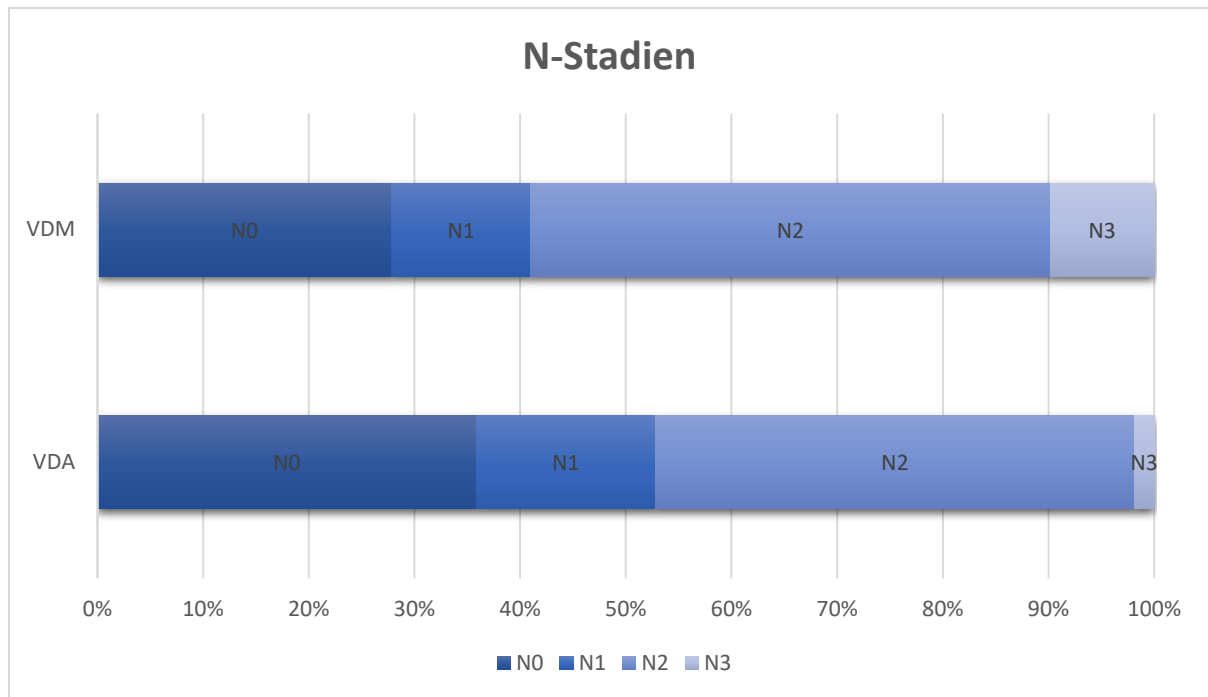


Abbildung 10: Statistische Auswertung der N-Stadien der untersuchten Patientenkollektive. Die Daten wurden in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel ausgewertet und in Balkendiagrammen dargestellt. Jeder Balken repräsentiert die prozentuale Verteilung der N-Stadien. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) mit dem Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM).

4.2.2 Präparatgröße, Tumoranteil, Leukozyteninfiltration

Das untersuchte Patientenkollektiv gliedert sich in ein Kollektiv von 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) und in ein Kollektiv von 53 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Um sicherzustellen, dass alle Präparate unabhängig vom zugehörigen Kollektiv dieselben Eigenschaften besitzen und um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen, erfolgte die Begutachtung wichtiger Präparatcharakteristika im Rahmen der Dissertationsarbeit „Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich“ von Herrn Dr. med. Benedikt Balensiefer (Universität des Saarlandes, Homburg). Dort wurde das in der vorliegenden Arbeit analysierte Patientenkollektiv (n=103) erstmals immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden Charakteristika wie die Präparatgröße, der Tumor- und Stromaanteil, sowie die Leukozyteninfiltration ausgewertet und in den Kollektiven verglichen. Die Analyse der Präparatgröße erfolgte anhand einer Größeneinteilung von 1 - 3, während die Bewertung des Tumoranteils und der Verteilung der Zellpopulationen über eine Skala von 1 - 4 erfolgte. Das Kollektiv der vorliegenden Arbeit ist im Vergleich zu dem der Arbeit von Herrn Dr. med. Balensiefer um 11 Patienten erweitert, deren Gewebeproben ebenfalls analysiert wurden und dieselben Präparateigenschaften und Größenverhältnisse aufweisen. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Ergebnisse der Auswertung von Herrn Balensiefer mit Erweiterung des Kollektivs um die 11 zusätzlichen Patienten zusammengefasst.

In Bezug auf die Präparatgröße konnten in der Auswertung keine relevanten Unterschiede zwischen dem VDA- und dem VDM-Kollektiv nachgewiesen werden. In der Regel nahmen die Gewebeproben etwa 10 – 40 % der Objektträgeroberfläche ein. Auch die Tumor- und Stromaanteile der Präparate zeigten in Bezug auf ihre jeweilige Präparatgröße keinen signifikanten Unterschied in den beiden Kollektiven (Abb. 11). Der Tumor und das Stroma machten jeweils ca. die Hälfte des Präparatgewebes aus (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg).

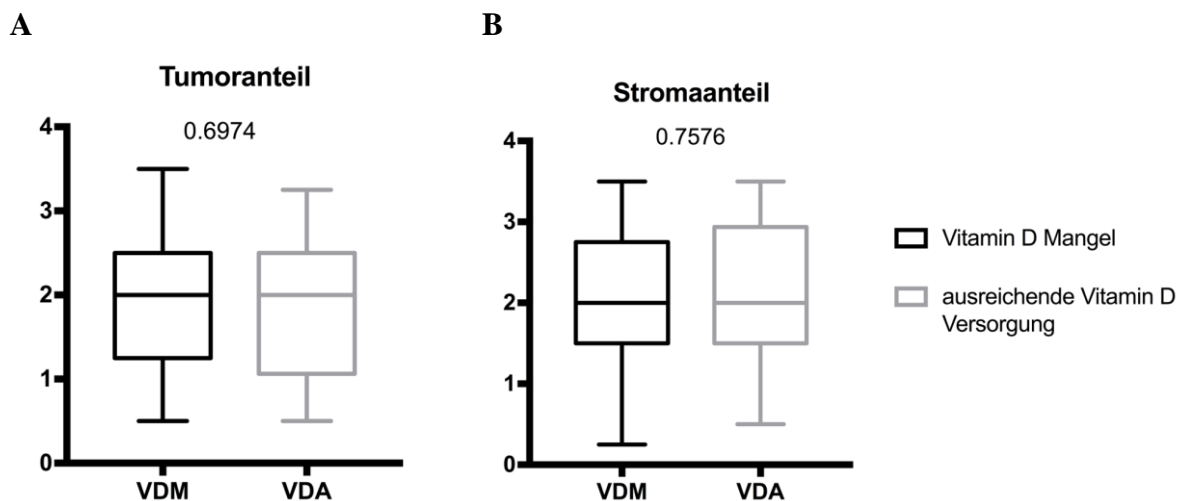


Abbildung 11: Statistische Auswertung des Tumoranteils (A) und des Stromaanteils (B) der Präparate.

Die Gewebeanteile wurden mittels einer Skala von 1 bis 4 bewertet und anschließend in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker repräsentieren die 1,5-fache Interquartilsrange (nach Tukey). VDA steht für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und VDM für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel (Benedikt Balensiefer, 2017).

Die Betrachtung der Leukozytenanzahl im Präparat lieferte einen hochsignifikanten Unterschied ($p = 0,0001$) zwischen den VDA- und VDM-Patienten zugunsten einer deutlich höheren Leukozytenzahl im VDA-Kollektiv. Um den Einfluss von Vitamin D auf das lokalisationspezifische Infiltrationsverhalten von Leukozyten beurteilen zu können, wurde zudem die Leukozytenverteilung auf Tumor- und Stromagewebe analysiert. Dabei zeigten sich signifikant mehr Leukozyten im Tumor der VDA-Patienten ($p < 0,0001$), wohingegen die VDM-Patienten eine höhere Anzahl an Leukozyten im Stroma aufwiesen (Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg). Diese Ergebnisse bestätigen eine Korrelation zwischen einem ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel und einer höheren Leukozytenzahl, sowie vermehrten Leukozyteninfiltration des tumoralen Gewebes. Eine vermehrte Infiltration des peritumoralen Stromas konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Um den Einfluss des Vitamin-D-Status auf die lytische Signatur der tumorinfiltrierenden Leukozyten zu ermitteln, wurden die Präparate von 114 Kopf-Hals-Tumorpatienten immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurden Antikörper gegen die lytischen Effektormoleküle Granzym A, Granzym B, Granzym K, Granulysin und Perforin verwendet. Unterschieden wurde zwischen dem Nachweis der jeweiligen Moleküle in intratumoral und peritumoral lokalisierten Leukozyten. Bei Granzym K, Granulysin und Perforin wurde zudem eine tumorale Expression der Moleküle analysiert, da sich in der Etablierung der entsprechenden Färbungen auch spezifische Färbereaktionen der Tumorzellen zeigten. Zur semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner verwendet (Remmele & Stegner 1987). Die Bewertungsskala setzt sich dabei aus der antikörperspezifischen Färbeintensität (0-3) multipliziert mit der Anzahl positiver Zellen (0-4) zusammen und ergibt so Werte zwischen 0 und 12.

4.3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym A an HNSCCs

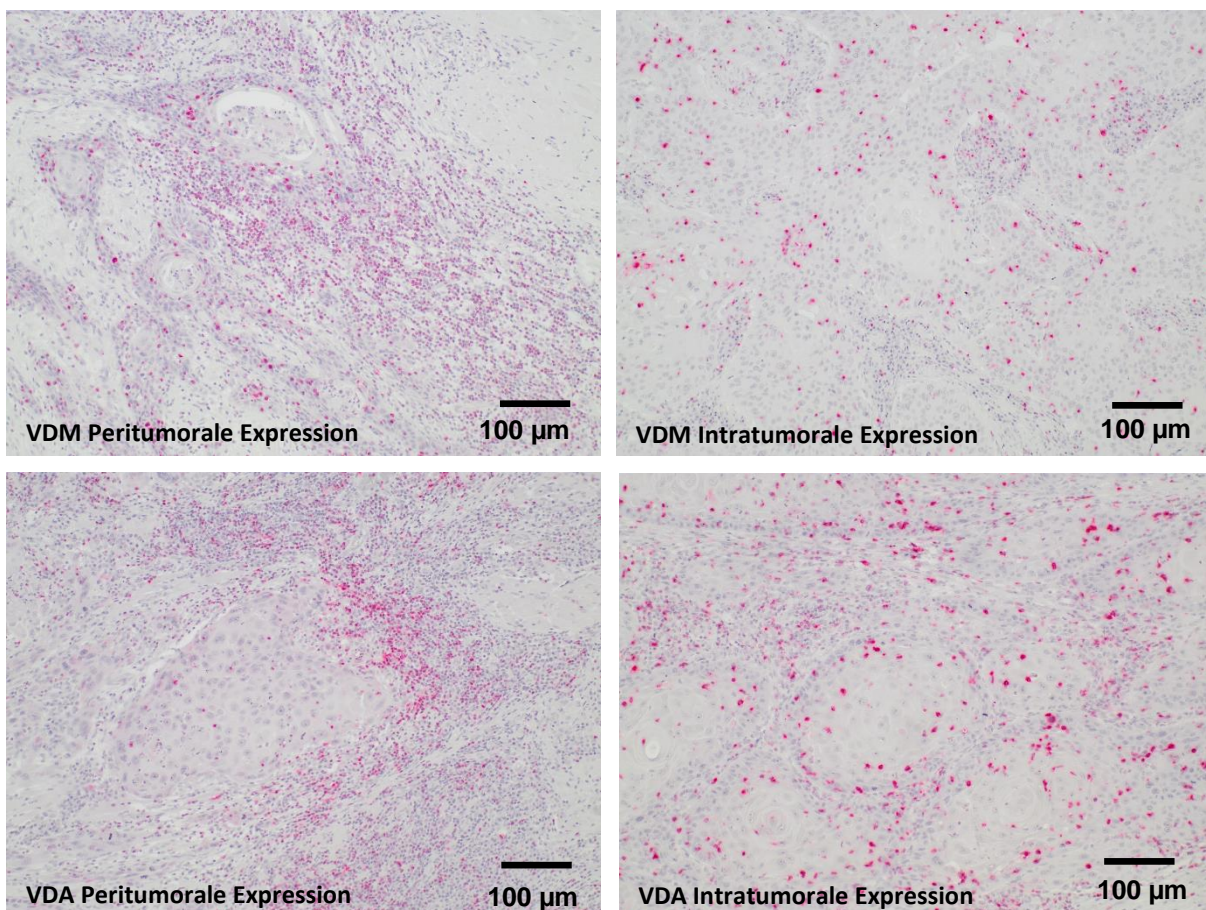


Abbildung 12: Granzym A-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Der Vergleich der peritumoralen und intratumoralen leukozytären Granzym-A-Expression ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der oberen und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der unteren Abbildungshälfte dargestellt.

Die Färbung Granzym-A-exprimierender Leukozyten bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für die peritumoral und die intratumoral lokalisierten Leukozyten, ist exemplarisch in Abbildung 12 dargestellt. Die spezifische Antikörper-Färbung der Zellen zeichnet sich durch ein intensiv rotes Färbefeld aus. Die Tumormorphologie ist durch ein invasives Wachstum und die Bildung von strangförmigen Zellverbänden und lokalisierten Tumorzellinseln gekennzeichnet.

Die statistische Auswertung der Granzym-A-Expression in intra- und peritumoralen Leukozyten ist in Abbildung 13 dargestellt. Sowohl bei der intratumoralen ($p = 0,7732$) als auch bei der peritumoralen ($p = 0,4933$) Granzym-A-Expression war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven festzustellen. Der Mittelwert der peritumoralen Expression der VDM-Patienten lag bei 3,877 mit einem Standardfehler von 0,3157 und der VDA-Patienten bei 4,519 mit einem Standardfehler von 0,4737. Der Mittelwert der intratumoralen Expression nahm im Kollektiv der VDA-Patienten den Wert 3,151 (Standardfehler 0,3385) und im Kollektiv der VDM-Patienten den Wert 3,180 (Standardfehler 0,3536) an. Der Median der peritumoralen Granzym-A-Expression betrug in beiden Kollektiven 3,5 während der Median der intratumoralen Granzym-A-Expression im VDM-Kollektiv den Wert 2,5 und den Wert 3,0 im VDA-Kollektiv annahm.

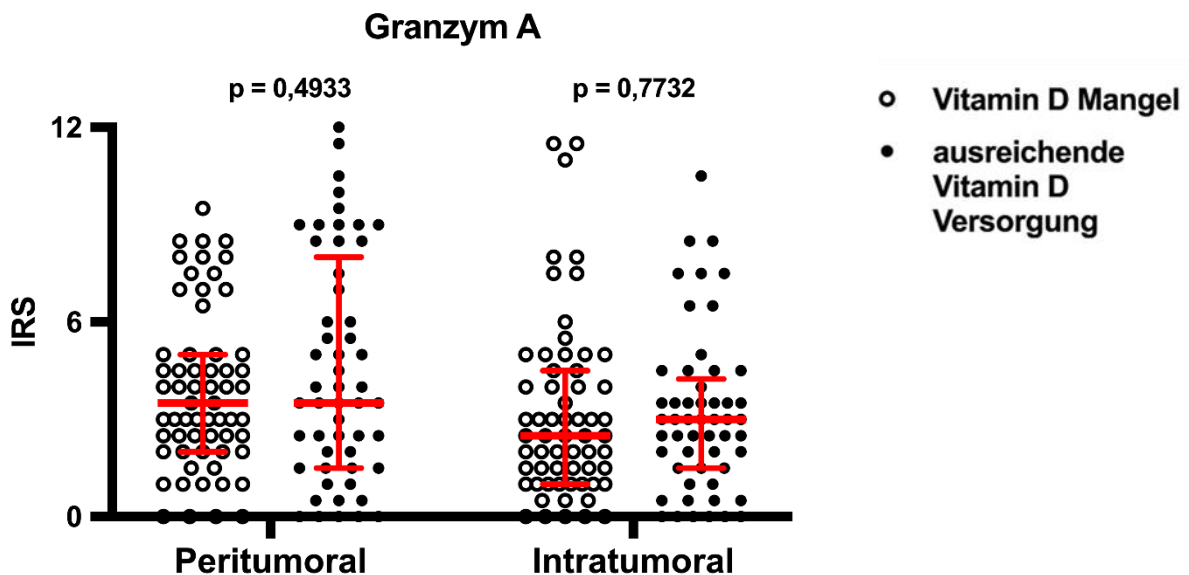


Abbildung 13: Statistische Auswertung der Granzym-A-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

4.3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym B an HNSCCs

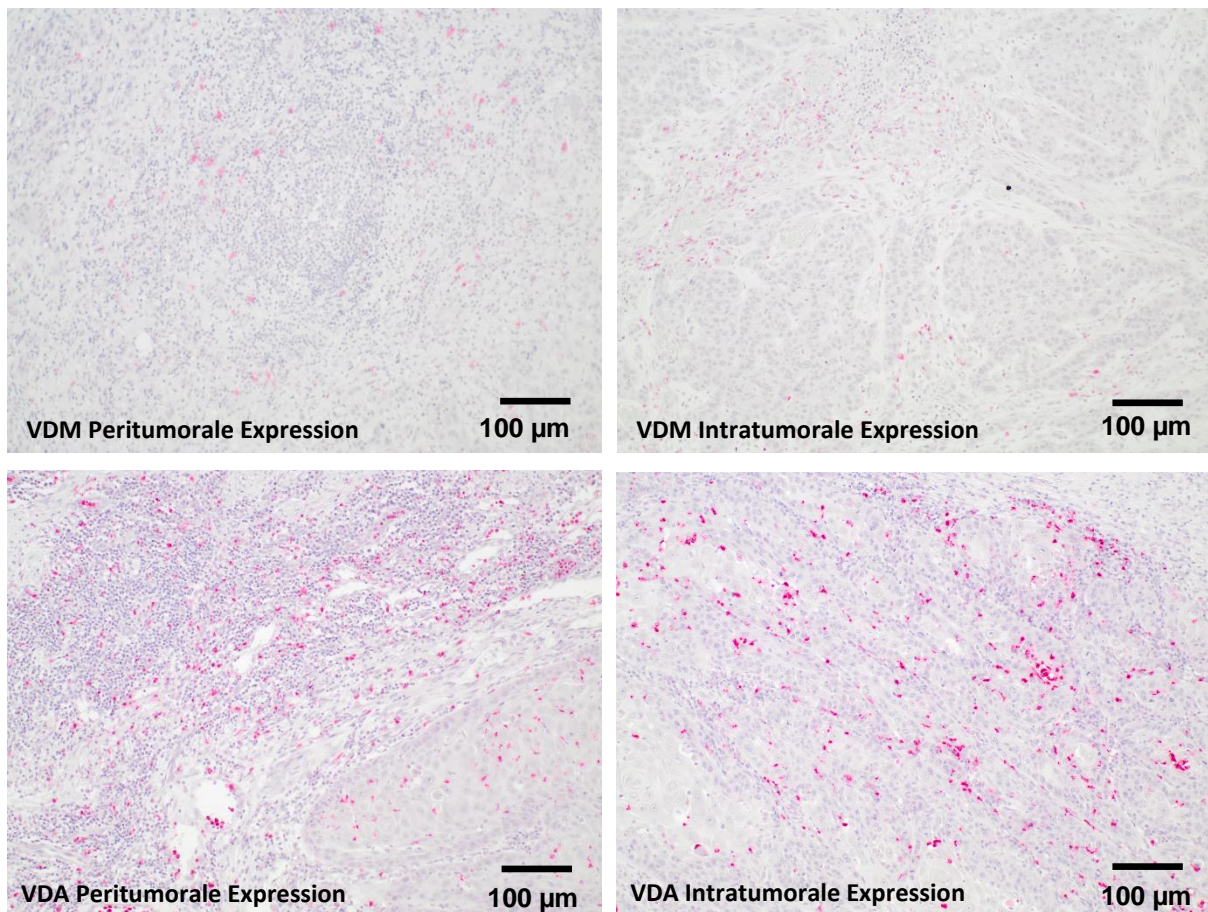


Abbildung 14: Granzym B-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Der Vergleich der peritumoralen und intratumoralen leukozytären Granzym-B-Expression ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der oberen und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der unteren Abbildungshälfte dargestellt.

In Abbildung 14 ist die Färbung Granzym-B-exprimierender Leukozyten bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für die peritumoral und die intratumoral lokalisierten Leukozyten, exemplarisch dargestellt. Bereits in dieser Abbildung ist zu erkennen, dass das Gewebe des Patienten mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine höhere Anzahl an gefärbten Zellen enthält, die zudem auch intensiver gefärbt sind.

Die statistische Auswertung der Granzym-B-Expression in intra- und peritumoralen Leukozyten ist in Abbildung 15 dargestellt und bestätigt den Eindruck der mikroskopischen Aufnahmen. Die intratumorale leukozytäre Granzym-B-Expression der VDA-Patienten zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich mit den VDM-Patienten ($p = 0,0026$). Der Mittelwert lag hier im VDA-Kollektiv bei 2,689 mit einem Standardfehler von 0,2647 und im VDM-Kollektiv bei 1,754 mit einem Standardfehler von 0,2170. Der Median der VDA-Patienten betrug 2,5 und der VDM-Patienten 1,5. Auch die peritumorale leukozytäre Granzym-B-Expression war im Kollektiv der VDA-Patienten signifikant ausgeprägter als im Kollektiv der VDM-Patienten ($p = 0,0023$). Der Mittelwert des VDA-Kollektivs lag bei 4,528 mit einem Standardfehler von 0,3585 und im VDM-Kollektiv bei 3,107 mit einem Standardfehler von 0,3545. Bei den VDA-Patienten betrug der Median 4,5, während er bei den VDM-Patienten den Wert 2,5 annahm.

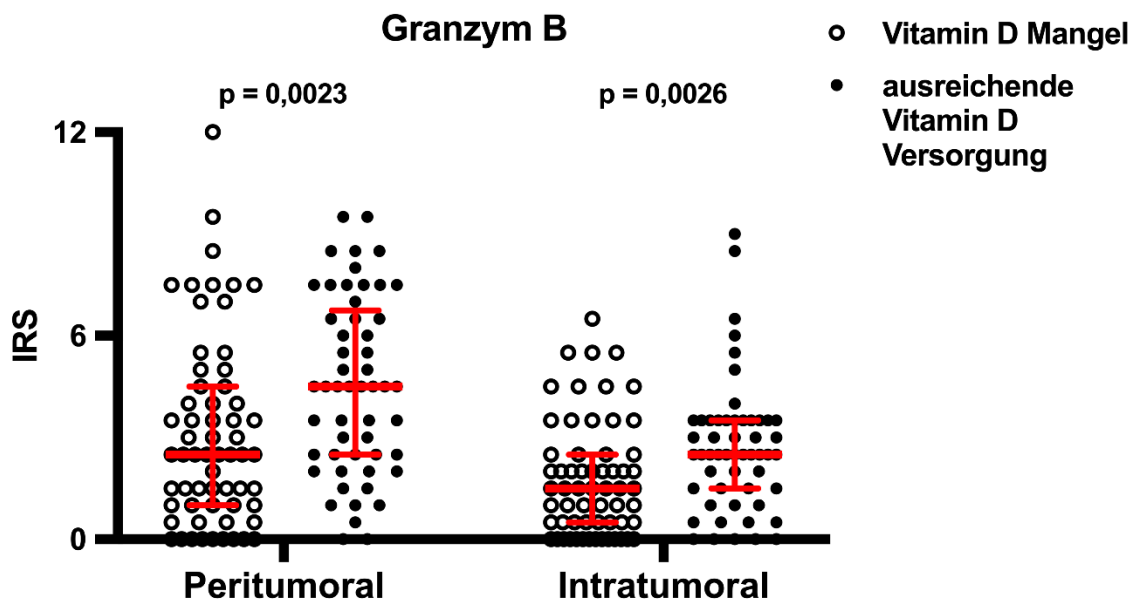


Abbildung 15: Statistische Auswertung der Granzym-B-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

4.3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granzym K an HNSCCs

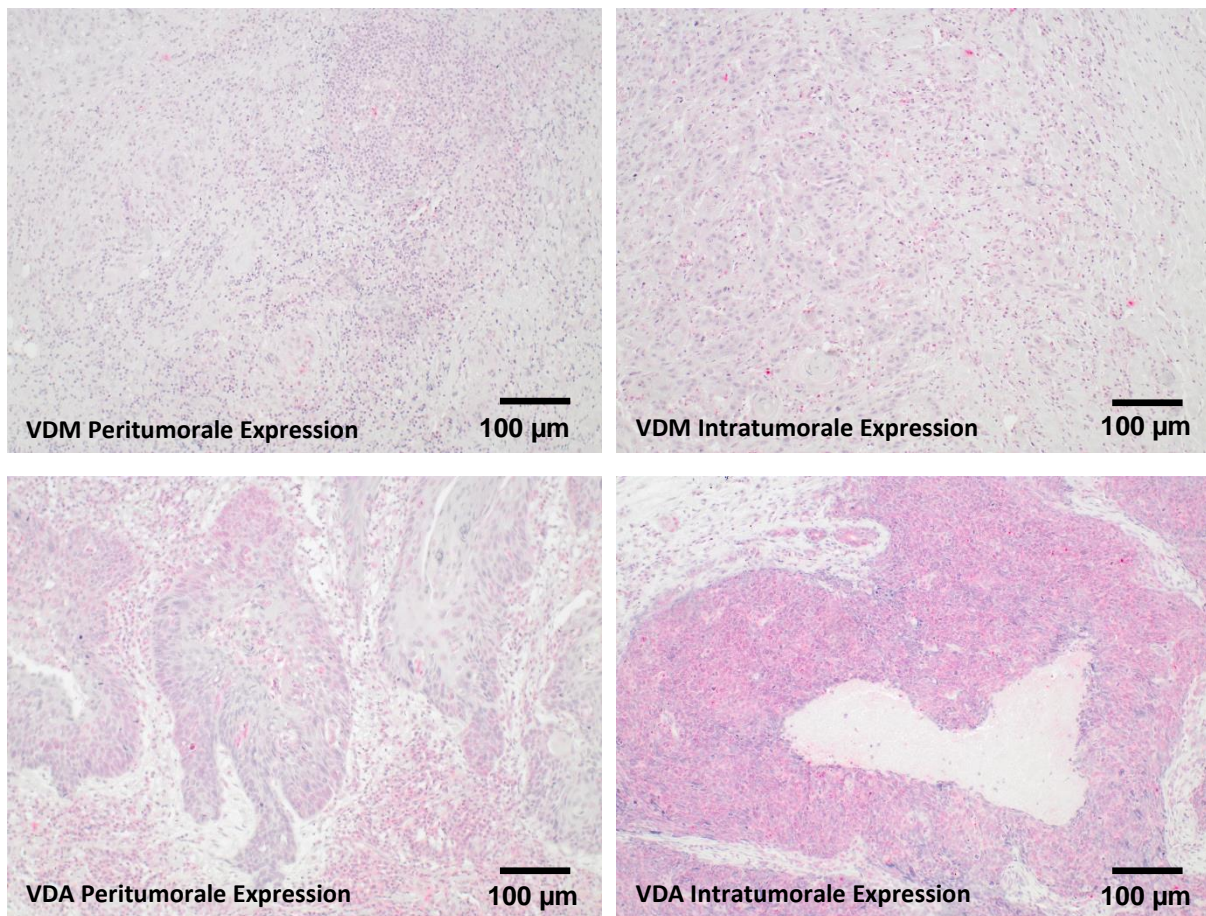


Abbildung 16: Granzym K-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Der Vergleich der peritumoralen und intratumoralen leukozytären Granzym-K-Expression ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der oberen und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der unteren Abbildungshälfte dargestellt.

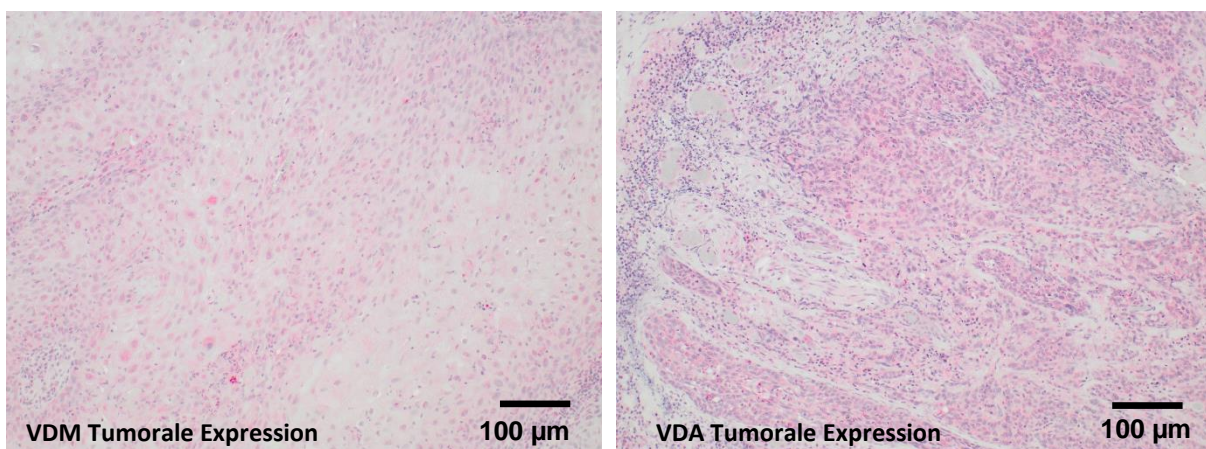


Abbildung 17: Granzym K-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Die Abbildung zeigt das tumorzellenspezifische Färbeverhalten repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der linken und für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der rechten Abbildungshälfte.

Die Färbung Granzym-K-exprimierender Leukozyten bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für die peritumoral und die intratumoral lokalisierten Leukozyten, ist in Abbildung 16 exemplarisch dargestellt. Bereits in dieser Abbildung ist zu erkennen, dass das Gewebe des Patienten mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine etwas höhere Anzahl an gefärbten Zellen enthält als das Gewebe des VDM-Patienten. Die Abbildung 17 zeigt die tumorale Expression von Granzym K exemplarisch für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

In Abbildung 18 ist die statistische Auswertung der Granzym-K-Expression in intra- und peritumoralen Leukozyten dargestellt. Die intratumorale leukozytäre Granzym-K-Expression der VDA-Patienten zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich mit den VDM-Patienten ($p = 0,0240$). Der Mittelwert lag hier im VDA-Kollektiv bei 1,406 mit einem Standardfehler von 0,1426 und im VDM-Kollektiv bei 0,9672 mit einem Standardfehler von 0,0912. Der Median der VDA-Patienten betrug 1,5 und der VDM-Patienten 1,0. Auch die peritumorale leukozytäre Granzym-K-Expression war im Kollektiv der VDA-Patienten signifikant ausgeprägter als im Kollektiv der VDM-Patienten ($p = 0,0276$). Der Mittelwert des VDA-Kollektivs lag bei 2,245 mit einem Standardfehler von 0,2111 und im VDM-Kollektiv bei 1,705 mit einem Standardfehler von 0,1820. Bei den VDA-Patienten betrug der Median 2,5, während er bei den VDM-Patienten den Wert 1,5 annahm.

Die statistische Auswertung der tumoralen Expression von Granzym K ist in Abbildung 19 gezeigt. Statistisch war der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven nicht signifikant ($p = 0,1142$), jedoch war eine Tendenz zu einer höheren Expression im VDA-Kollektiv festzustellen. Der Mittelwert des VDM-Kollektivs betrug 1,910 (Standardfehler 0,1462), der des VDA-Kollektivs 2,415 (Standardfehler 0,2137). Der Median beider Kollektive lag bei 2,0.

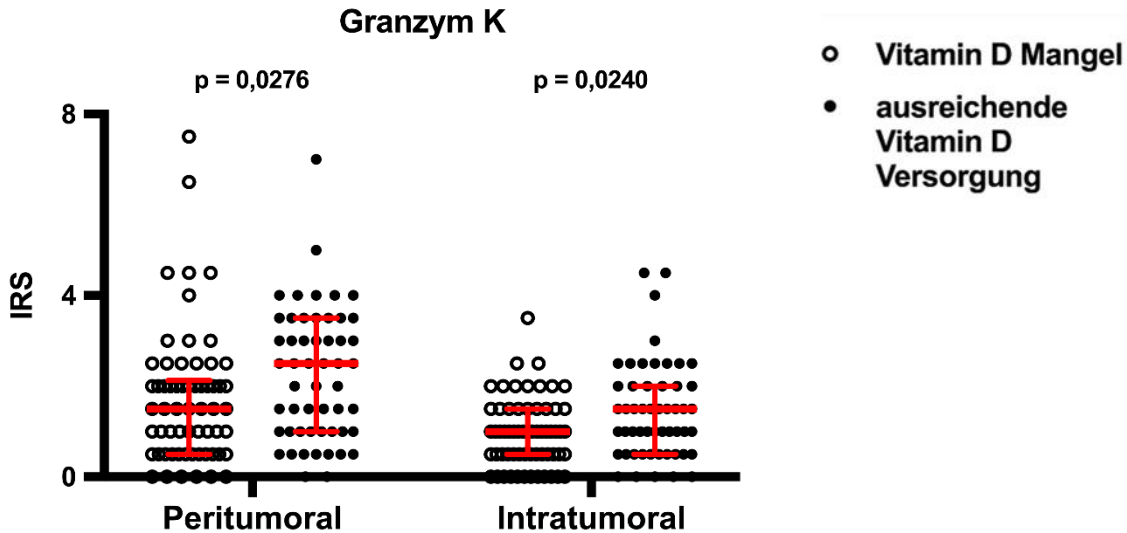


Abbildung 18: Statistische Auswertung der Granzym-K-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

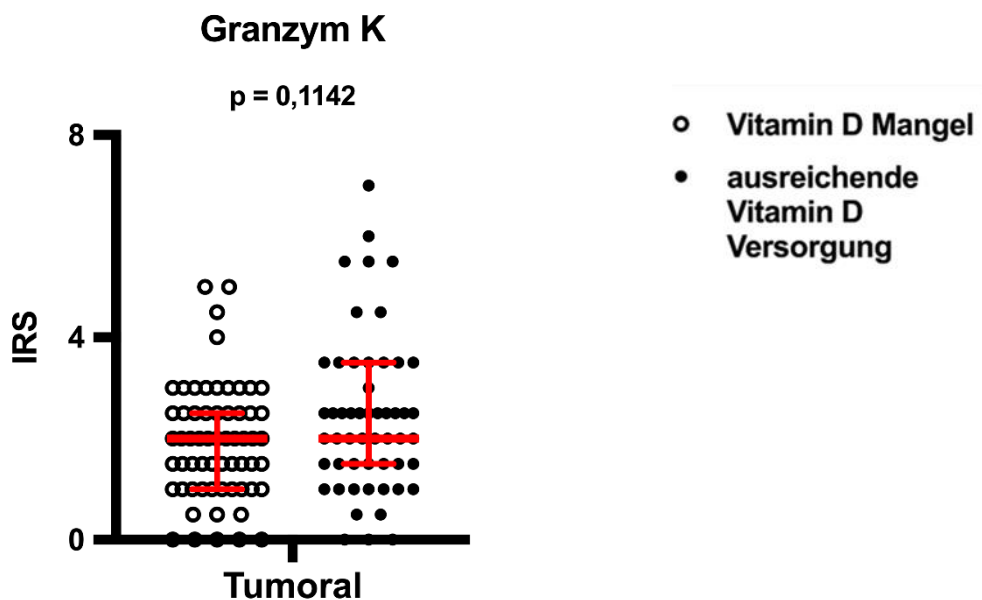


Abbildung 19: Statistische Auswertung der tumoralen Expression von Granzym-K in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

4.3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Granulysin an HNSCCs

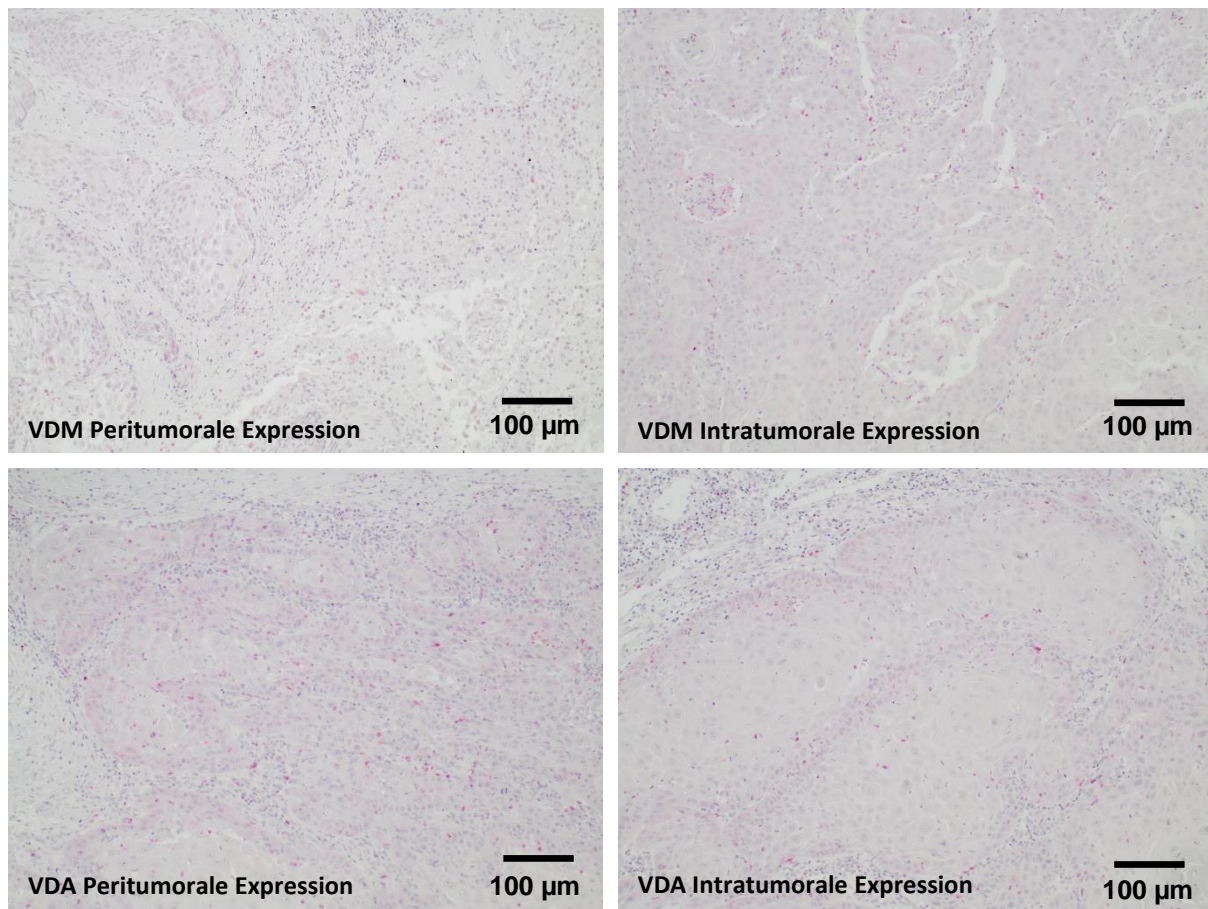


Abbildung 20: Granulysin-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Der Vergleich der peritumoralen und intratumoralen leukozytären Granulysin-Expression ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der oberen und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der unteren Abbildungshälfte dargestellt.

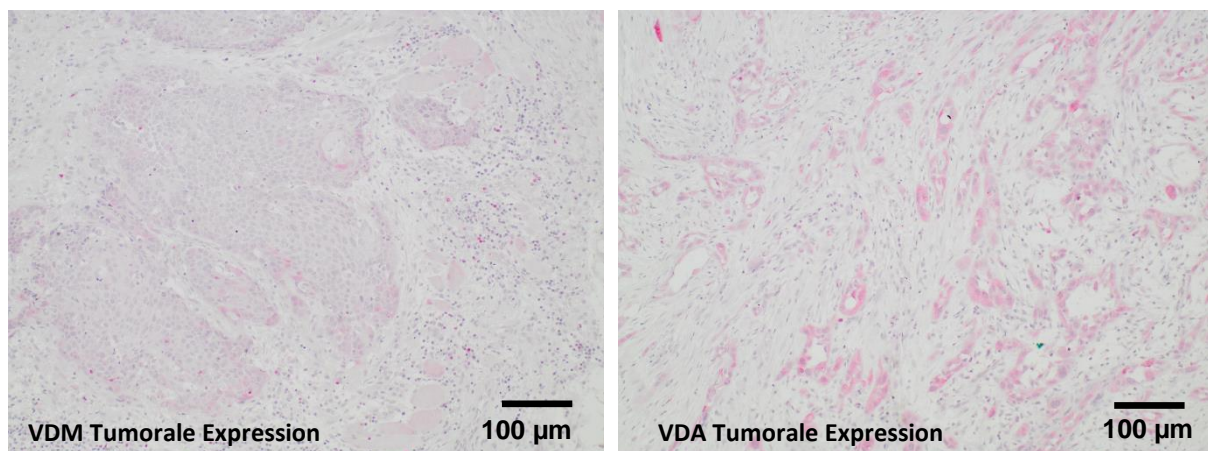


Abbildung 21: Granulysin-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Die Abbildung zeigt das tumorzellenspezifische Färbeverhalten repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der linken und für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der rechten Abbildungshälfte.

Die Abbildung 20 zeigt die typische Färbung Granulysin-exprimierender Leukozyten exemplarisch bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für die peritumoralen und die intratumoralen Leukozyten. In Abbildung 21 ist die tumorale Expression von Granulysin exemplarisch für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) dargestellt. Bereits in dieser Abbildung ist zu erkennen, dass das Tumorgewebe des Patienten mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ein intensiveres Färbepild aufweist.

Die Abbildung 22 zeigt die statistische Auswertung der Granulysin-Expression in intra- und peritumoral lokalisierten Leukozyten. Sowohl bei der intratumoralen ($p = 0,3008$) als auch bei der peritumoralen ($p = 0,2880$) Granulysin-Expression war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven festzustellen. Der Mittelwert der peritumoralen Expression der VDM-Patienten lag bei 1,803 mit einem Standardfehler von 0,2203 und der VDA-Patienten bei 1,896 mit einem Standardfehler von 0,1907. Der Mittelwert der intratumoralen Expression nahm im Kollektiv der VDA-Patienten den Wert 1,660 (Standardfehler 0,1909) und im Kollektiv der VDM-Patienten den Wert 1,664 (Standardfehler 0,2409) an. Der Median der peritumoralen Granulysin-Expression im VDM-Kollektiv betrug 1,0 und im VDA-Kollektiv 1,5, während der Median der intratumoralen Granulysin-Expression in beiden Kollektiven den Wert 1,0 annahm.

Die statistische Auswertung der tumoralen Expression ist in Abbildung 23 gezeigt. Die tumorale Expression von Granulysin war bei den VDA-Patienten signifikant höher als bei den VDM-Patienten ($p = 0,0109$). Der Mittelwert des VDM-Kollektivs betrug 1,754 (Standardfehler 0,1919), der des VDA-Kollektivs 2,689 (Standardfehler 0,2842), während der Median sowohl der VDM-Patienten als auch der VDA-Patienten bei 1,5 lag.

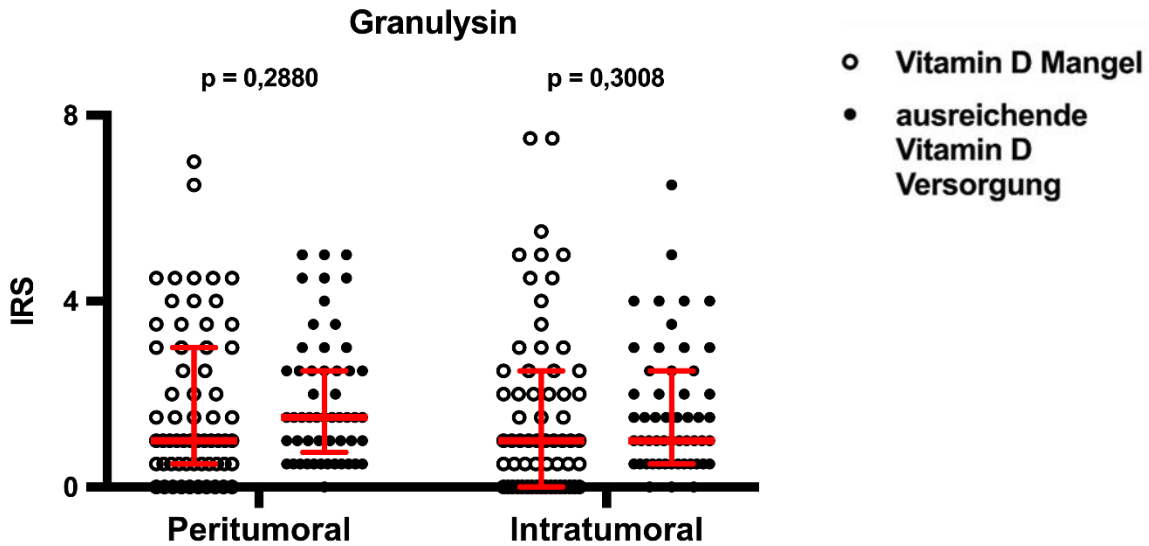


Abbildung 22: Statistische Auswertung der Granulysin-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

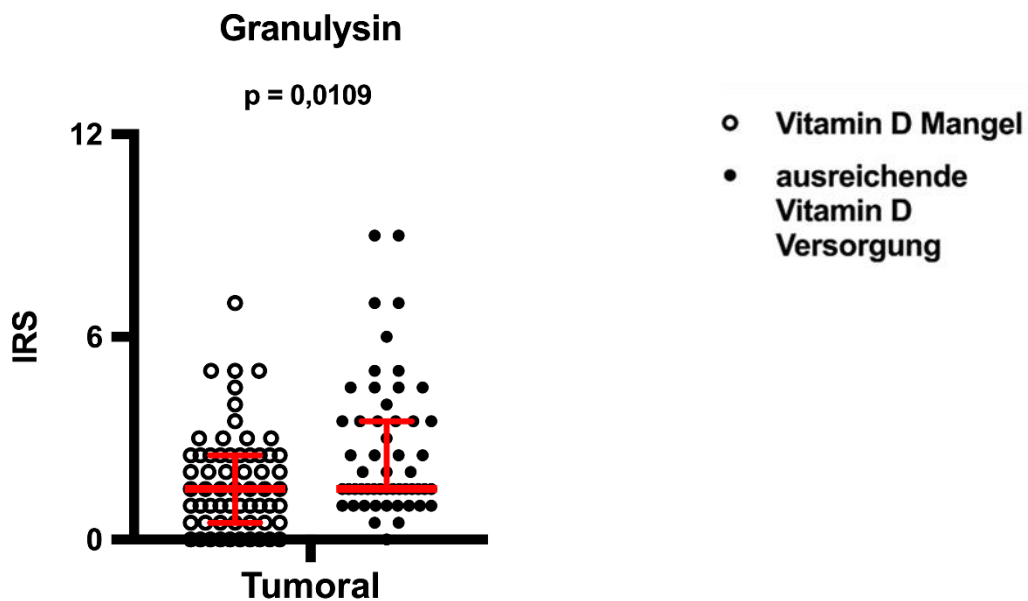


Abbildung 23: Statistische Auswertung der tumoralen Expression von Granulysin in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

4.3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Perforin an HNSCCs

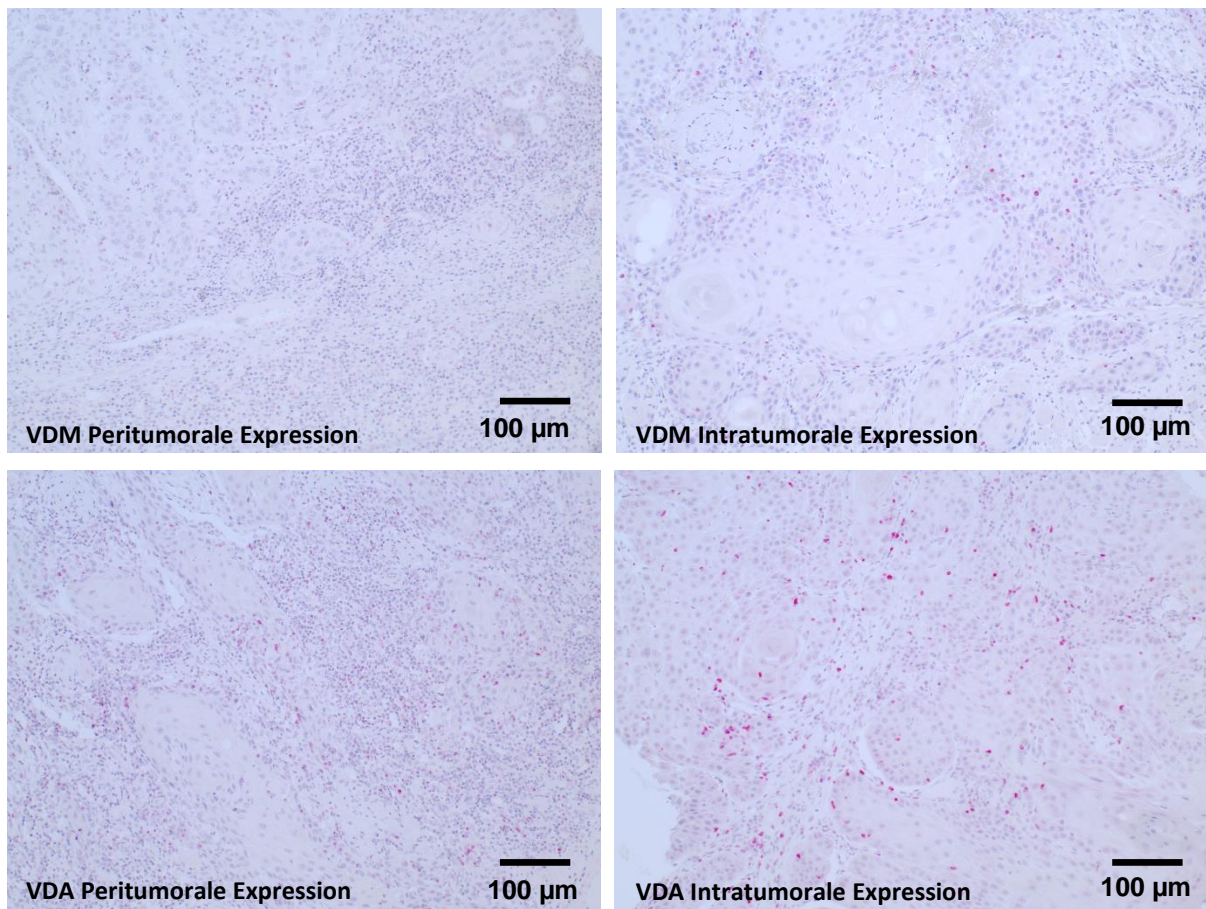


Abbildung 24: Perforin-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Der Vergleich der peritumoralen und intratumoralen leukozytären Perforin-Expression ist repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der oberen und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der unteren Abbildungshälfte dargestellt.

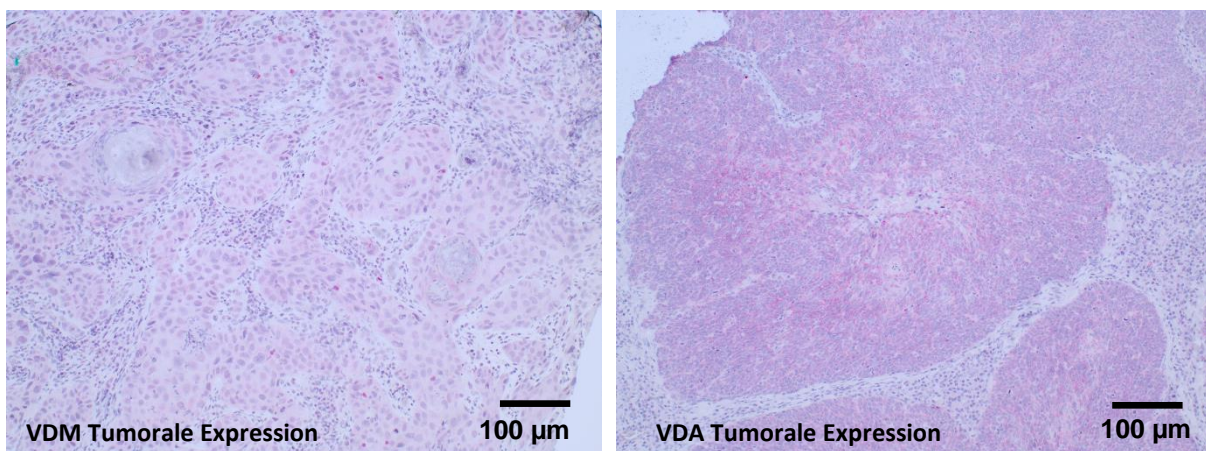


Abbildung 25: Perforin-Immunhistochemie an HNSCC-Präparaten. Die Abbildung zeigt das tumorzellenspezifische Färbeverhalten repräsentativ für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) in der linken und für einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA) in der rechten Abbildungshälfte.

Die Färbung Perforin-exprimierender Leukozyten bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für die peritumorale und die intratumorale Leukozyten, ist in Abbildung 24 exemplarisch dargestellt. Bereits in dieser Abbildung ist zu erkennen, dass das Gewebe des Patienten mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine höhere Anzahl an gefärbten Zellen enthält. Die Abbildung 25 zeigt die tumorale Expression von Perforin exemplarisch für einen Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und einen Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA). Auch hier ist in der Abbildung zu erkennen, dass das Tumorgewebe des Patienten mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ein intensiveres Färbepild aufweist.

In Abbildung 26 ist die statistische Auswertung der Perforin-Expression in intra- und peritumoralen Leukozyten dargestellt. Die intratumorale leukozytäre Perforin-Expression der VDA-Patienten zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich mit den VDM-Patienten ($p = 0,0030$). Der Mittelwert lag hier im VDA-Kollektiv bei 1,764 mit einem Standardfehler von 0,1991 und im VDM-Kollektiv bei 1,164 mit einem Standardfehler von 0,1873. Der Median der VDA-Patienten betrug 1,5 und der VDM-Patienten 0,5. Auch die peritumorale leukozytäre Perforin-Expression war im Kollektiv der VDA-Patienten signifikant ausgeprägter als im Kollektiv der VDM-Patienten ($p = 0,0044$). Der Mittelwert des VDA-Kollektivs lag bei 2,123 mit einem Standardfehler von 0,2383 und im VDM-Kollektiv bei 1,287 mit einem Standardfehler von 0,1314. Bei den VDA-Patienten betrug der Median 1,5, während er bei den VDM-Patienten den Wert 1,0 annahm.

Die statistische Auswertung der tumoralen Expression von Perforin ist in Abbildung 27 gezeigt. Auch hier war die Expression bei den VDA-Patienten signifikant höher als bei den VDM-Patienten ($p = 0,0023$). Der Mittelwert des VDM-Kollektivs betrug 1,516 (Standardfehler 0,2421), der des VDA-Kollektivs 2,538 (Standardfehler 0,3080), während der Median der VDM-Patienten bei 1,0 und der VDA-Patienten bei 2,0 lag.

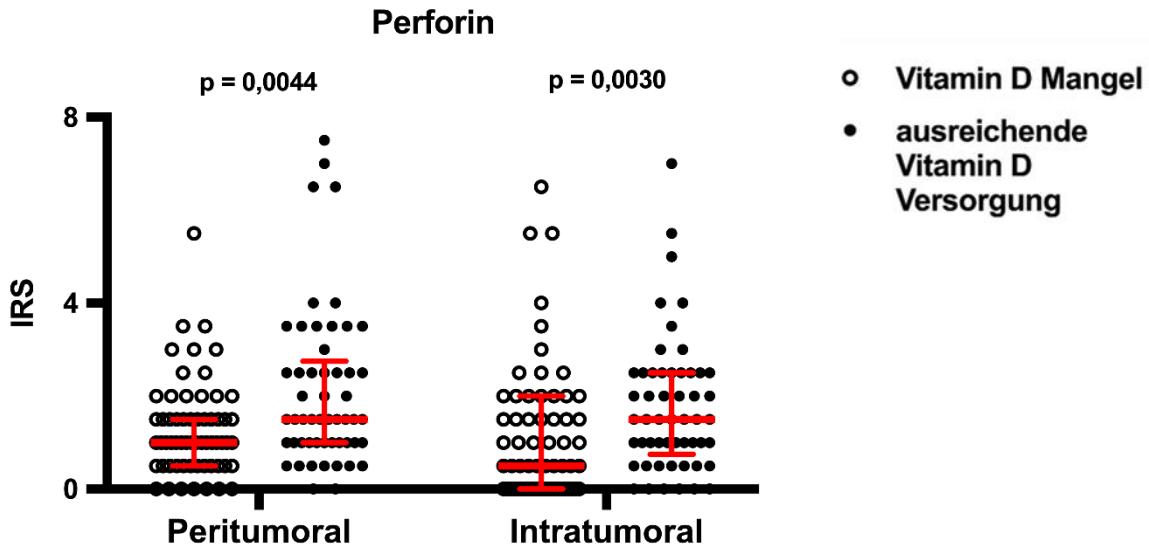


Abbildung 26: Statistische Auswertung der Perforin-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

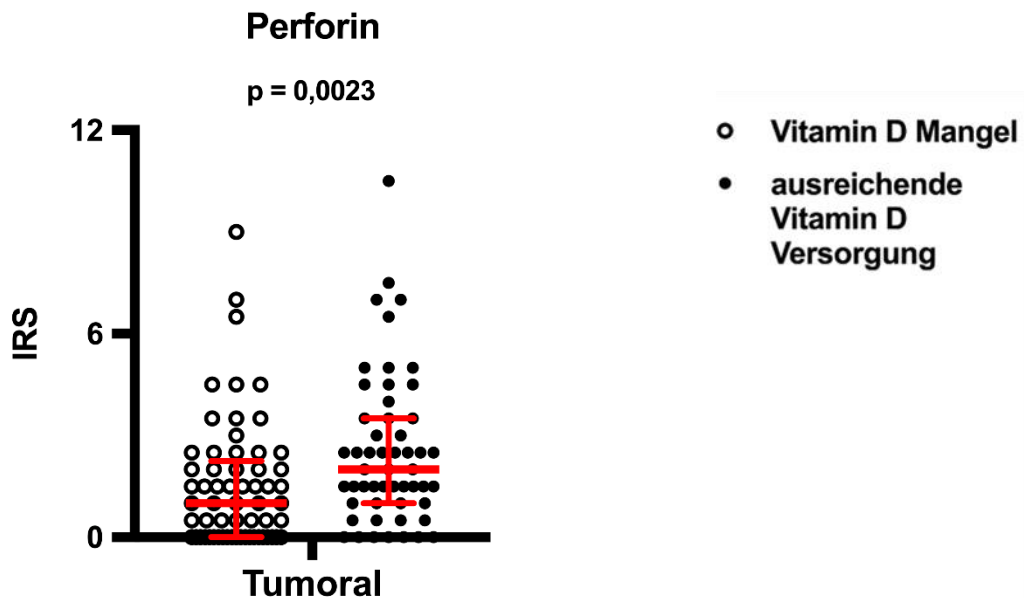


Abbildung 27: Statistische Auswertung der tumoralen Perforin-Expression in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Spiegel. Mithilfe eines Immunreaktiven Scores (IRS) wurde die antikörperspezifische Färbung ausgewertet und in scattered Dotplots dargestellt. Der Median wird durch eine rote Linie angegeben. Die Whisker repräsentieren den Interquartilsabstand vom ersten bis zum dritten Quartil. Verglichen wurde das Kollektiv der Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) mit dem Kollektiv der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (VDA).

4.4 Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die immunhistochemischen Analysen der lytischen Effektormoleküle Granzym B und Granzym K zeigten bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine signifikante Steigerung ihrer leukozytären Expression im Tumor sowie im peritumoralen Stroma. Besonders deutlich wurde die vermehrte intra- und peritumorale leukozytäre Expression auch bei Perforin, dessen tumorale Expression zudem bei ausreichendem Vitamin-D-Serumspiegel signifikant erhöht war. Bei Granzym K dagegen war kein signifikanter Einfluss der Vitamin-D-Versorgung auf die tumorale Expression festzustellen. Bezüglich der intra- und peritumoralen leukozytären Expression von Granzym A und Granulysin konnte kein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven nachgewiesen werden. Im Falle von Granulysin zeigte sich allerdings eine signifikant gesteigerte tumorale Expression bei der Betrachtung des VDA-Kollektivs.

4.5 Überlebensanalyse

4.5.1 Überlebensanalyse abhängig vom Vitamin-D-Status

In der nach der Kaplan-Meier-Analyse erstellten Überlebenskurve des Patientenkollektivs (Abb. 28) wird deutlich, dass ein ausreichender Vitamin-D-Serumspiegel zu einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben der Patienten führt ($p = 0,0188$). Die Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung lebten mit einem medianen Überleben von 31 Monaten im Schnitt 10 Monate länger als die Patienten mit Vitamin-D-Mangel, deren medianes Überleben bei 21 Monaten lag. Die Hazard Ratio für die Gesamtsterblichkeit der Patienten mit Vitamin-D-Mangel betrug 2,010, während die Hazard Ratio der Gesamtsterblichkeit der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung bei 0,4575 lag. Daraus resultiert ein um ca. 150 % erhöhtes Sterberisiko für Kopf-Hals-Tumorpatienten mit Vitamin-D-Mangel im Vergleich zu den HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung.

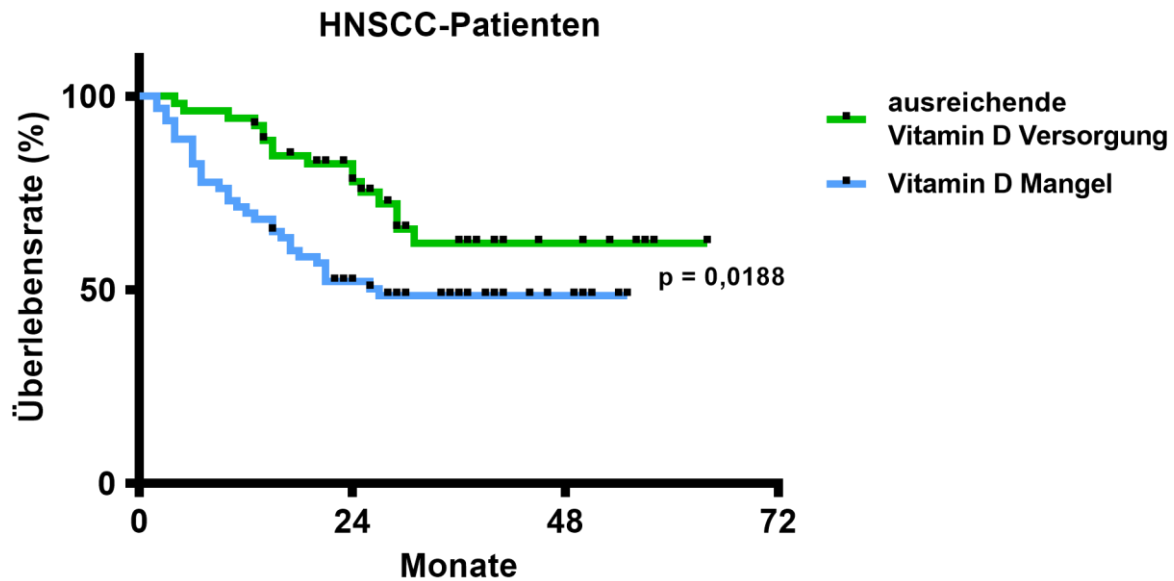


Abbildung 28: Einfluss der Vitamin-D-Versorgung auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten. Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Patientenkollektivs in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status. Die Kurve der VDA-Patienten ist in grün angegeben, die der VDM-Patienten in blau. Zensierte Daten werden durch schwarze Punkte angegeben.

4.5.2 Überlebensanalysen abhängig von immunhistochemischen Parametern

Um das Patientenkollektiv in eine Gruppe mit niedriger und eine Gruppe mit hoher Expression der lytischen Effektormoleküle einzuteilen, wurde der gerundete Mittelwert aller Immunreaktiven Scores (IRS) für jeden untersuchten Antikörper (Granzym A, Granzym B, Granzym K, Granulysin, Perforin) ermittelt. Anschließend wurden die Patienten in ein Kollektiv mit IRS-Werten unterhalb des Mittelwertes und ein Kollektiv mit IRS-Werten, die dem Mittelwert entsprachen oder darüber lagen, eingeteilt. Der IRS-Mittelwert für die leukozytäre peritumorale Expression von Granzym A und Granzym B betrug jeweils 4,0, für die intratumorale Granzym-A-Expression 3,0 und für die intratumorale Granzym-B-Expression 2,0. Bei Granzym K und Granulysin lagen die IRS-Mittelwerte für die peritumoralen Leukozyten jeweils bei 2,0, für die intratumoralen Leukozyten bei Granzym K bei 1,0 und bei Granulysin bei 1,5. Für die tumorale Expression von Granzym K, Granulysin und Perforin betragen die IRS-Mittelwerte jeweils 2,0. Sowohl der Mittelwert der intratumoralen als auch der peritumoralen leukozytären Perforin-Expression lag bei 1,5.

Die nach Kaplan-Meier-Analyse erstellte Überlebenskurve in Abbildung 29A zeigt ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($p = 0,0321$) für Patienten mit einer höheren tumoralen Perforin-Expression im Vergleich zu den Patienten mit einer niedrigeren tumoralen Perforin-Expression. Zudem scheint eine höhere intratumorale leukozytäre Perforin-Expression mit einem geringfügigen Überlebensvorteil bei HNSCC-Patienten assoziiert zu sein ($p = 0,2394$, Abb. 29B). Auch bei der intratumoralen leukozytären Granzym K-Expression war eine leichte Tendenz zu einem verlängerten

Gesamtüberleben ($p = 0,1652$) bei Patienten mit hoher intratumoraler Granzym-K-Expression im Vergleich zu solchen mit niedriger intratumoraler Granzym-K-Expression zu erkennen (Abb. 29C). Bei der peritumoralen leukozytären Expression von Granzym K war diese Tendenz jedoch nur sehr abgeschwächt zu beobachten ($p = 0,2812$, Abb. 29D). In den untersuchten Patientenkollektiven zeigte sich zudem kein Überlebensvorteil in Abhängigkeit von der leukozytären Granzym-A- oder Granzym-B-Expression (Daten nicht gezeigt). Auch das Ausmaß der tumoralen Granzym-K- und Granulysin-Expression beeinflusste das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

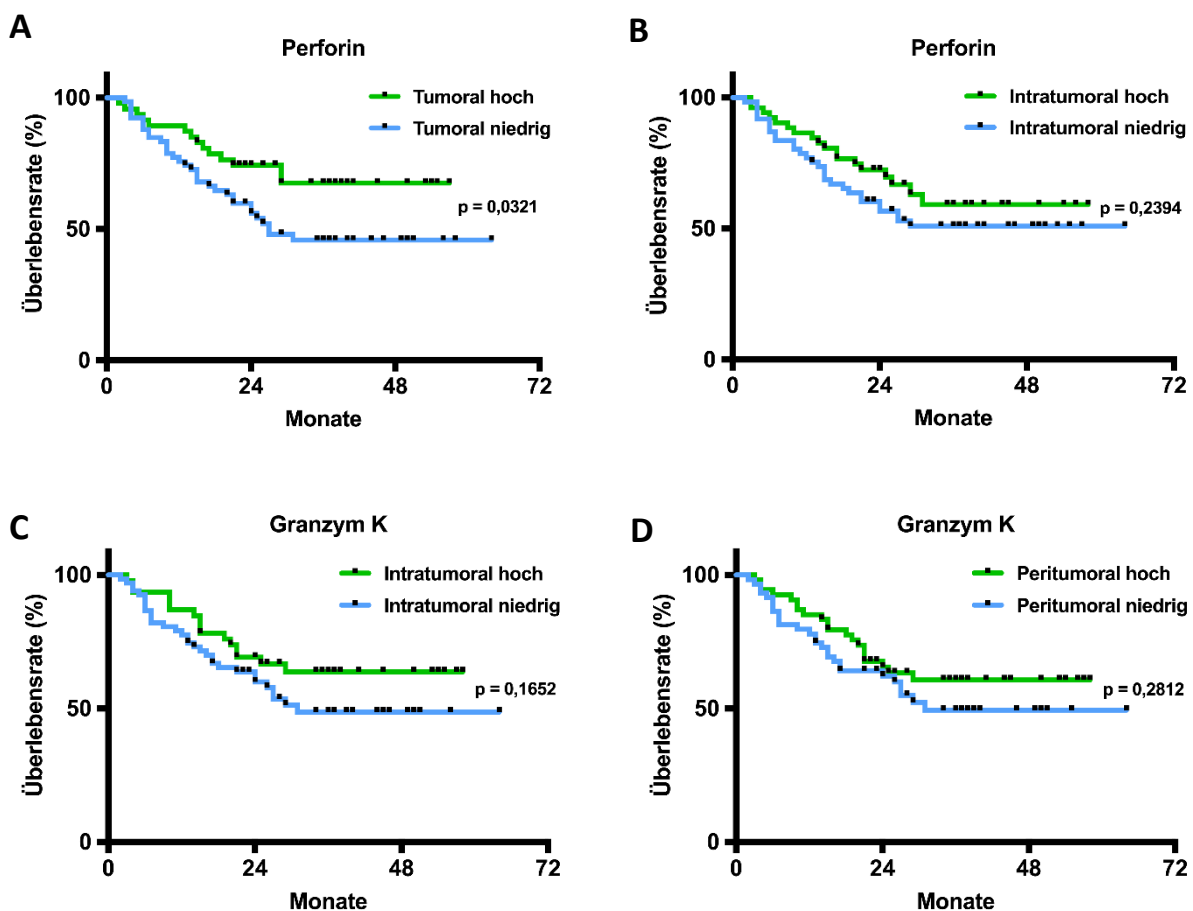


Abbildung 29: Einfluss der Expression der lytischen Effektormoleküle auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten. Die Abbildung zeigt Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Patientenkollektivs in Abhängigkeit von der tumoralen Perforin-Expression (A), von der intratumoralen leukozytären Perforin- (B) und Granzym-K-Expression (C), sowie von der peritumoralen leukozytären Granzym-K-Expression (D). Die Kurve der hohen Enzymexpression ist jeweils in grün angegeben, die der niedrigen Enzymexpression in blau. Zensierte Daten werden durch schwarze Punkte symbolisiert.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung von Vitamin-D und immunmodulatorischen Therapiekonzepten in der Kopf-Hals-Onkologie

Bösartige Tumorerkrankungen stellen bereits heute die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar und werden auch in den Gesundheitssystemen weltweit immer relevanter werden, da durch eine zunehmend älter und multimorbider werdende Bevölkerung in den kommenden Jahren eine Zunahme der Tumorzinzidenz zu erwarten ist (Gaber and Wildner, 2011; World Health Organization, 2017; Ferlay *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wird sich die wissenschaftliche Forschung um passende Therapiestrategien und fortschrittliche Diagnostik bemühen müssen, um die malignen Tumorerkrankungen frühzeitig zu erkennen und effizient behandeln zu können. Weltweit zählen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs als sechsthäufigste Tumorentität zu den führenden Tumorerkrankungen und sind in der Mehrzahl der Fälle mit einem langjährigen Nikotin- und Alkoholabusus oder einer Infektion der Mund-/Rachenschleimhaut mit humanen Papillomviren vom „high-risk“-Typ assoziiert (Kaatsch and Spix, 2019).

Die Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen gestaltet sich trotz aller Bemühungen in innovativer Forschung und der Entwicklung neuer Therapiekonzepte wie dem EGFR-Antikörper Cetuximab oder den gegen PD-1 gerichteten Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab weiterhin ausgesprochen schwierig. Die Heterogenität der verschiedenen Tumorlokalisationen sowie das meist bereits fortgeschrittene Tumorstadium bei Erstvorstellung der Patienten erschweren dabei eine effektive Tumorthherapie (Gerlinger *et al.*, 2012). Auch die immunesvasiven Mechanismen des Tumors und die generell reduzierte Immunkfunktion, die häufig bei Kopf-Hals-Tumorpatienten vorliegt, schränken die Eindämmung der Tumorprogression deutlich ein (Beatty and Gladney, 2015). Diese Faktoren erschweren somit die erfolgreiche und nebenwirkungsarme Tumorthherapie, was sich auch in der seit vielen Jahren nahezu unveränderten 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50-60% widerspiegelt (Mandal *et al.*, 2016; Kaatsch and Spix, 2019).

Zur Behandlung der Kopf-Hals-Tumoren stehen die chirurgische Resektion, die Radio- und Chemotherapie sowie seit Kurzem auch die Therapie mit einem EGFR-Antikörper und Checkpoint-Inhibitoren zur Verfügung, die sowohl einzeln als auch kombiniert eingesetzt werden (Schmoll *et al.*, 2013; Ferris *et al.*, 2016; Machiels *et al.*, 2020). Allerdings weisen diese Therapiekonzepte bei fortgeschrittenen Tumoren häufig eine eingeschränkte Wirksamkeit und ausgeprägte Toxizität auf, da die Strahlen- oder Chemotherapie neben den Tumorzellen auch die gesunden Körperzellen stark schädigen kann (Ramos *et al.*, 2010; Wolff *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wird in der onkologischen Forschung nach neuen Methoden gesucht, um den Tumor effektiv zu bekämpfen und die therapieassoziierte Toxizität und die Nebenwirkungen zu reduzieren. Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die Betrachtung der körpereigenen Tumorabwehr durch das Immunsystem und die daraus abgeleiteten immunmodulatorischen Therapieansätze.

Innovative onkologische Therapiekonzepte zielen auf die Verbesserung der körpereigenen Anti-Tumor-Reaktion ab. Die Entstehung eines Tumors ist davon abhängig, ob das humane Immunsystem die Tumorzelle als entartete Zelle erkennen und zerstören kann, bevor es zu einer unkontrollierten Proliferation kommt. An der körpereigenen natürlichen Tumorabwehr sind dabei unter anderem B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen beteiligt. Die B-Zellen produzieren nach einer Aktivierung durch die T-Zellen Tumorantigen-spezifische Antikörper zur gezielten Bekämpfung des Tumors. Bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches wurden zahlreiche Antikörper gegen verschiedene Tumorantigene wie p53, p40, MUC1 sowie HPV-E6 und HPV-E7 nachgewiesen (Zumbach *et al.*, 2000). Daneben spielen verschiedene Zytokine wie IL-2, IL-12 oder auch TNF- α eine wichtige Rolle in der natürlichen Tumorabwehr (Rink *et al.*, 2015). Tumorzellen haben jedoch zelluläre Mechanismen entwickelt, um die immunologische Reaktion gegen den Tumor zu umgehen und durch eine Veränderung ihrer Oberflächenstruktur die Aktivität der Immuneffektorzellen zu modulieren. Zahlreiche Studien zum molekularbiologischen Aufbau von Tumoren und deren Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem weisen dabei auf verschiedene tumorale Mechanismen zur Hemmung der Anti-Tumor-Immunreaktion hin (Walker *et al.*, 2012; Young and Day, 2013; Ferris, 2015). So kann durch Beeinflussung tumorassoziierter Makrophagen und regulatorischer T-Zellen die Tumorentwicklung und –progression gefördert werden (Badoual *et al.*; Chen and Mellman, 2013). Auch der regulatorische TH2-Subtyp der CD4-positiven T-Zellen kann durch die Tumorzellen zur Sezernierung inhibitorischer Zytokine, die das Tumorwachstum fördern, manipuliert werden (Badoual *et al.*, 2006; Chikamatsu *et al.*, 2007). Neue immunonkologische Therapieansätze, die aktuell in experimentellen und klinischen Studien untersucht werden, zielen daher darauf ab, die tumorprogressionsfördernde Beeinflussung des Immunsystems weitgehend aufzuheben und dagegen die antitumoralen Faktoren der Immunreaktion effektiv zu stärken (Kansy *et al.*, 2015).

Zu den unterschiedlichen Ansätzen dieser immunonkologischen Therapien zählen dabei neben der Inhibierung onkogener Signalwege wie VEGFR oder EGFR mittels Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonaler Antikörper und den Immun-Checkpoint-Inhibitortherapien (Kansy *et al.*, 2015; Ferris *et al.*, 2016; Burtneß *et al.*, 2019; Cohen *et al.*, 2019), auch die Vakzinierungen in Reaktion auf die steigende Zahl der HPV-positiven Tumoren (Ramqvist and Dalianis, 2010). Die Komplexität des Immunsystems und die molekulare Heterogenität des Tumors erschweren dabei allerdings die Herstellung und Anwendung geeigneter Therapien. In vielen Fällen zeigen die aktuell zugelassenen Medikamente nicht bei allen Tumoren eine Wirksamkeit, was durch die unterschiedliche Expression der spezifischen Zielmoleküle zu einer eingeschränkten Anwendbarkeit führt. Das Therapieansprechen hängt dabei neben den tumorintrinsic Faktoren auch von der Immunfunktion des Patienten und damit verbunden chronischen Entzündungen oder einer generellen Immunschwäche ab. Zytokintherapien, die an dem inhibierenden Zytokin VEGF angreifen, sind bereits in der Behandlung von Kolorektal-, Zervix- sowie Lungenkarzinomen zugelassen und werden derzeit in verschiedenen Studien auch für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren getestet (Kansy *et al.*, 2015; Bußmann *et al.*,

2018; Wu *et al.*, 2018). Die Entwicklung tumorantigenspezifischer monoklonaler Antikörper ermöglicht zudem die gezielte Beeinflussung konkreter Komponenten der molekularen Tumorstrukturen. So zeigen fast alle Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), dessen Signalübertragung über den monoklonalen Antikörper Cetuximab gezielt blockiert werden kann (Cohen, 2014). Seit seiner Zulassung im Jahre 2006 wird Cetuximab bei fortgeschrittenen HNSCCs in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie eingesetzt und führt zu einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zu alleiniger Chemo- oder Strahlentherapie (Bonner *et al.*, 2010; Concu and Cordeiro, 2018). Neue immunmodulatorische Therapieansätze wurden in den letzten Jahren insbesondere auch durch die Entdeckung von Immun-Checkpoint-Rezeptoren, die die Aktivierung von Immuneffektorzellen steuern, ermöglicht (Kansy *et al.*, 2015). Über eine Blockade dieser Immun-Checkpoint-Rezeptoren sollen so die stimulierenden Signale auf die T-Lymphozyten verstärkt und die hemmenden Signale blockiert werden. Der klinische Erfolg der Immun-Checkpoint-Blockade hängt dabei aber von der ausreichenden Präsenz des Zielantigens sowie dem Immunstatus des Patienten ab. In Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass bei geeigneten Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium eine Immun-Checkpoint-Therapie zu einem verbesserten Therapieansprechen mit Tumorregress oder zumindest einer „stable disease“ führt (Weber *et al.*, 2015; Chow *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016). Seit Mai 2017 ist der Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab in Europa bei Platin-refraktären Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zugelassen, während der Anti-PD-1-Antikörper Pembrolizumab erst im Oktober 2018 für Platin-refraktäre HNSCC-Patienten mit einer ausreichend hohen PD-L1-Expression zugelassen wurde (Ferris *et al.*, 2016; Cohen *et al.*, 2019). Im Oktober 2019 wurde die Zulassung für Pembrolizumab als Einsatz in der first line Therapie bei Patienten mit rezidiviertem oder fernmetastasiertem HNSCC erweitert, basierend auf den Daten der KEYNOTE-48 Studie (Burtneß *et al.*, 2019).

Im Vergleich zu den gängigen chemo- und strahlentherapeutischen Konzepten ist die Immuntherapie mit einer weniger stark ausgeprägten therapieassoziierten Langzeittoxizität assoziiert. Allerdings besitzen immunmodulatorische Therapien andere bedeutsame Nebenwirkungen, zu denen unter anderem die Autoimmunhepatitis und -hypophysitis sowie die Autoimmunenzephalitis zählen und die häufig auch zum Abbruch der Therapie führen können (Schadendorf, 2015; Laban *et al.*, 2015; Guidi *et al.*, 2020). Zudem sind die derzeitigen Immuntherapeutika nur in bestimmten Tumorstadien, nach chemo- oder strahlentherapeutischer Vorbehandlung oder häufig auch nur in Kombination mit anderen Medikamenten und bei Nachweis einer PD-L1-Expression zugelassen. Das führt dazu, dass die Zahl der tatsächlich mit diesen vielversprechenden Therapeutika behandelten Patienten sehr eingeschränkt ist bei einer nach wie vor nur mäßigen Ansprechrate von ca. 30 % und Therapiekosten von mehr als 100.000€ pro Jahr und Patient. Immunmodulatoren führen darüber hinaus derzeit nur in einzelnen Fällen zu einer kompletten Remission des Tumors und werden daher meist erst nach anderen erfolglosen Therapieversuchen eingesetzt (Mehra *et al.*, 2020; T. Yokota *et al.*, 2020; Tomoya Yokota *et al.*, 2020).

Der Zeitpunkt des Therapiebeginns stellt ein weiteres nicht zu vernachlässigendes Problem dar. Eine Therapie der Tumorerkrankung kann erst begonnen werden, wenn der Tumor klinisch bzw. diagnostisch nachzuweisen ist, was in Bezug auf eine effektive immunmodulatorische Therapie eigentlich bereits zu spät ist. Zu diesem Zeitpunkt sind die tumoralen Prozesse des „Immunoediting“ bereits abgelaufen und der Tumor hat sich der Kontrolle des Immunsystems größtenteils entzogen. Da entartete Zellen als Vorläufer eines Karzinoms bereits einige Jahre vor der sicher zu diagnostizierenden Tumorerkrankung im menschlichen Organismus vorhanden sind (Cowell, 2001), wäre eine immunonkologische Therapie in diesem frühen Stadium der Karzinogenese am effektivsten. Eine frühzeitige, sichere Diagnose dieser tumoralen Vorläuferzellen ist jedoch nach dem derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Forschung noch nicht möglich und verhindert so eine immuntherapeutische Primärprävention der Karzinomerkrankung. Aus diesem Grund ist eine Stärkung und Funktionsverbesserung des Immunsystems aller Patienten besonders wichtig, um eine direkte körpereigene Abwehr der Tumorerkrankung zu ermöglichen. Die besondere Bedeutung dieser funktionsfähigen körpereigenen Immunabwehr zur Primärprävention und gezielten immunmodulatorischen Behandlung von Tumorerkrankungen mit stark immunsuppressiven Eigenschaften, wie die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, verlangt daher zukünftig weitere Forschungsansätze zur Weiterentwicklung und Entdeckung potentieller immunsupportiver Wirkstoffe.

Eine Verbindung zwischen den exogenen medikamentösen immunmodulatorischen Behandlungsstrategien und einer endogenen Stimulation des Immunsystems könnte das Steroidhormon Vitamin-D herstellen. Vitamin-D zeigt, neben seinen physiologischen Funktionen im Knochenstoffwechsel, in zahlreichen Studien auch eine Wirkung auf die Funktion des Immunsystems (Mora *et al.*, 2008; Baeke *et al.*, 2010; Prietl *et al.*, 2013; Kongsbak *et al.*, 2014). Zahlreiche Immunzellen verfügen über einen Vitamin-D-Rezeptor, über den ihre Reifungs- und Differenzierungsvorgänge beeinflusst werden können (Bouillon *et al.*, 2008; Yu and Cantorna, 2008; Toubi and Shoenfeld, 2010). Betrachtet man so die Wirkungen des Vitamin-D auf das körpereigene Immunsystem unter Berücksichtigung der Immunescape-Mechanismen in der Tumorentstehung, könnte Vitamin-D eine unterstützende Komponente in der endogenen Tumorabwehr darstellen. Diese immunsupportive Wirkung des Vitamin-D konnte bereits in einigen experimentellen und klinischen Studien bestätigt werden, welche eine Assoziation zwischen einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel (> 20 ng/ml) und einem erniedrigten Erkrankungsrisiko und einer deutlich verminderten Mortalität für gastrointestinale Tumore sowie Prostata- und Mammakarzinome nachweisen konnten (Garland *et al.*, 2006; Giovannucci *et al.*, 2006; Moukayed and Grant, 2017). Auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs konnten einige Studien ähnliche Ergebnisse nachweisen. Hier korrelierte ein erniedrigter Vitamin-D-Serumspiegel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, einer schlechteren Prognose für HNSCC-Patienten sowie einer erhöhten Inzidenz von Nikotin-induzierten Tumorentitäten (Satake *et al.*, 2003; Fanidi *et al.*, 2016; Moukayed and Grant, 2017). In tierexperimentellen Studien zur Behandlung bukkaler Beuteltumoren konnte zudem die

klinische Wirksamkeit einer Vitamin-D-Substitution durch eine signifikant supprimierte Tumorentstehung belegt werden (Meier *et al.*, 2007). Auffällig ist darüber hinaus, dass Kopf-Hals-Tumorpatienten eine beachtlich höhere Inzidenz eines Vitamin-D-Mangels aufweisen, was in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen werden konnte (Orell-Kotikangas *et al.*, 2012; Bochen *et al.*, 2018). Die Studie von Bochen *et al.* konnte zudem eine Korrelation zwischen einem Vitamin-D-Mangel und einer stärker ausgeprägten lymphogenen Metastasierung sowie einem verkürzten Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten belegen (Bochen *et al.*, 2018). In immunhistochemischen Analysen zeigten HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung außerdem eine signifikant gesteigerte peri- und intratumorale Immuneinfiltration des Tumorgewebes, wohingegen ein Vitamin-D-Mangel mit einer verminderten Expression des lytischen Effektormoleküls Granzym B durch die Lymphozyten assoziiert zu sein scheint (Yuzefpolskiy *et al.*, 2014; Bochen *et al.*, 2018). Auch andere Studien konnten den Einfluss von Vitamin-D auf das Immunsystem von Kopf-Hals-Tumorpatienten nachweisen, indem eine aktive Substitution von Vitamin-D bei HNSCC-Patienten zu einer gesteigerten peritumoralen Infiltration mit CD42- und CD8-positiven T-Zellen sowie aktivierten T-Zellen führte und es zudem zu einer erhöhten Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-10 im Tumorgewebe der mit Vitamin-D behandelten Patienten kam (Walsh *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2012). Da in der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches die gezielte Therapie mit therapeutischen Antikörpern und Checkpoint-Inhibitoren eine immer größere Bedeutung bekommt, könnte Vitamin-D hierbei als supportiver Faktor in der Optimierung dieser Therapien fungieren. Berger *et al.* konnten so bereits eine unterstützende Wirkung von Vitamin-D auf die Cetuximab-Behandlung von metastasierten Kolonkarzinomen nachweisen (Berger *et al.*, 2018). Auch in der Behandlung von Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) konnte eine Studie die effizienzverbessernde Wirkung einer Vitamin-D-Substitution auf die Rituximab-Therapie dieser Patienten belegen (Bittenbring *et al.*, 2014). Diese Studien haben deshalb dazu beigetragen, dass am Universitätsklinikum des Saarlandes der 25-OH-Vitamin-D-Spiegel bei allen HNSCC-Patienten bestimmt und Vitamin-D bei Nachweis eines Vitamin-D-Mangels substituiert wird. Eine große Metaanalyse des British Journal of Cancer (n = 44.165, 64 Studien) konnte ebenfalls ein verbessertes Gesamtüberleben für Tumorpatienten mit einem ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegel (Hazard-Ratio: 0,74) nachweisen (Vaughan-Shaw *et al.*, 2017). Neben anderen Tumorentitäten wurde in diesen Studien auch die prognostische Relevanz der Vitamin-D-Versorgung von HNSCC-Patienten untersucht und zeigte ebenfalls einen Überlebensvorteil der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Zusammenfassend veranschaulichen diese Studien den positiven Einfluss von Vitamin-D auf die immunologische Tumorabwehr sowie die Prognose von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches. Vor dem Hintergrund der kostengünstigen und nebenwirkungsarmen Möglichkeit der Substitution, bildet Vitamin-D daher einen vielversprechenden immunsupportiven Behandlungsansatz in der multimodalen, immuntherapeutischen Behandlung von Kopf-Hals-Tumorpatienten.

Einschränkend muss an dieser Stelle aber erwähnt werden, dass wenige Studien zur Bedeutung des Vitamin-D-Status bei Kopf-Hals-Tumorpatienten keine prognostische Relevanz eines ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegels auf die Erkrankungshäufigkeit und das Gesamtüberleben nachweisen konnten (Arem *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2011). In der Studie von Meyer *et al.* wurde bei 540 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren verschiedener Entitäten das Auftreten von Rezidiven und neuen Zweitumoren in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Serumspiegel untersucht. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass Vitamin-D keinen Einfluss auf das Outcome dieser Patienten hat (Meyer *et al.*, 2011). Eine andere Studie konnte ebenfalls keinen Einfluss von Vitamin-D auf die Häufigkeit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bei finnischen Männern nachweisen (Arem *et al.*, 2011). Demgegenüber stehen jedoch zahlreiche Studien, die einen prognoseverbessernden Einfluss eines physiologisch ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegels auf maligne Tumorerkrankungen (Gugatschka *et al.*, 2011; Moukayed and Grant, 2017; Vaughan-Shaw *et al.*, 2017) und einen positiven Einfluss auf die antitumorale Immunreaktion bestärken (Baeke *et al.*, 2010; Prietl *et al.*, 2013; Young and Day, 2013b). Ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz dieser Resultate könnten zahlreiche potentielle Fehlerquellen darstellen, die auf die Datenanalyse einwirken und nur sehr schwer zu kontrollieren sind. Insbesondere Unterschiede in der Exposition von Risikofaktoren (Tabak und Alkohol), der Dauer der Sonnenlichtexposition, dem HPV-Status und den Lebensgewohnheiten der Patienten einschließlich der Ernährung sowie unterschiedliche Definitionen einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung bzw. eines Vitamin-D-Mangels können zu einer Verzerrung der statistischen Datenanalyse und damit der Schlussfolgerungen einer Studie führen. Zudem betrachten die oben genannten Studien lediglich retrospektive Daten mit eingeschränkten Fallzahlen, ohne dabei molekularbiologische Untersuchungen miteinzubeziehen, die für eine genauere Analyse der Wirkung von Vitamin-D auf die immunologische Tumorabwehr und die Prognose von Tumorpatienten nötig wären. Eine weitere Studie von Manson *et al.* untersuchte den Einfluss einer täglichen Substitution von 2000 IU Vitamin-D₃ auf die Inzidenz und Mortalität von Tumoren sowie kardiovaskulären Ereignissen. Sie kam zu dem Ergebnis, dass eine Vitamin-D-Substitution zu keiner signifikanten Abnahme der Tumorinzidenz führte, während bei der Tumorsterblichkeit ein geringer positiver Effekt der Vitamin-D-Substitution zu beobachten war (Manson *et al.*, 2019). Einen wichtigen Punkt, der bei der Interpretation dieser Studienergebnisse zu berücksichtigen ist, stellen die Ausgangswerte der Vitamin-D-Serumspiegel vor Beginn der Substitution dar. Mehr als 85% der Probanden wiesen Ausgangswerte von über 20 ng/ml auf, was nach den meisten Definitionen keinem konkreten Vitamin-D-Mangel entspricht. In der deutschen Bevölkerung dagegen konnten Studien einen weit verbreiteten, signifikanten Vitamin-D-Mangel (< 20 ng/ml) nachweisen (13. DGE-Ernährungsbericht, 2016). Zudem ist ein erhöhtes Risiko der Malignomentstehung erst bei Vitamin-D-Serumspiegeln unter 20 ng/ml zu erwarten (Garland *et al.*, 2006; Giovannucci *et al.*, 2006; Moukayed and Grant, 2017), was zu einer kritischen Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie bezüglich der protektiven Bedeutung und prognostischen Relevanz von Vitamin-D bei Tumorpatienten führt.

5.2 Einfluss von Vitamin-D auf die Expression lytischer Effektormoleküle bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches

Eine gesteigerte Immunezellinfiltration, welche maßgeblich an der Effektivität und dem Ansprechen immunologischer Therapieansätze beteiligt ist, wurde bereits bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung im intra- und peritumoralen Stroma nachgewiesen, wohingegen ein Vitamin-D-Mangel mit einer verminderten Granzym B-Expression assoziiert zu sein scheint (Yuzefpolskiy *et al.*, 2014; Bochen *et al.*, 2018). Über die genaue biologische Wirkung des Vitamin-D auf die lytische Aktivität der tumorinfiltrierenden zytotoxischen Immunzellen ist allerdings noch wenig bekannt. Diese Fragestellung ist jedoch für die Effektivität der antitumoralen Immunreaktion äußerst relevant, da aus zahlreichen Studien bekannt ist, dass eine ausgeprägte Immuneinfiltration eines Tumors nicht mit einer effektiven antitumoralen Immunaktivität gleichzusetzen ist. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, inwieweit sich die immunologische Aktivität der tumorinfiltrierenden Leukozyten von Tumorpatienten mit einem Vitamin-D-Mangel und von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung unterscheiden. Hilft eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung die zytotoxische Anti-Tumor-Immunreaktion zu steigern? Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Vitamin-D auf die lytische Aktivität der tumorspezifischen Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen an Tumorgewebeproben eines 114 HNSCC-Patienten umfassenden Kollektivs mit fünf verschiedenen Antikörpern durchgeführt und anschließend semiquantitativ ausgewertet. Das untersuchte Kollektiv bestand aus 61 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und 53 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Der Vitamin-D-Mangel wurde dabei im Vorfeld als Serumkonzentration unter 10 ng/ml und die ausreichende Vitamin-D-Versorgung als Serumkonzentration über 15 ng/ml definiert. Insgesamt wurden so ca. 1000 immunhistochemische Präparate angefertigt, zu denen neben den Antikörperfärbungen auch die Positiv- und Negativkontrollen sowie die Gewebeschnitte zur Etablierung des Versuchsprotokolls zählen. Es wird davon ausgegangen, dass die verwendeten Antikörper primär die lytischen Effektormoleküle in den Immun- und Tumorzellen anfärben. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass nicht ausschließlich diese Effektormoleküle dargestellt wurden, da eine unspezifische Hintergrundfärbung nicht hundertprozentig auszuschließen ist. Die verwendeten Antikörper waren gegen die zu untersuchenden lytischen Effektormoleküle Granulysin, Granzym A, Granzym B, Granzym K und Perforin gerichtet. Unterschieden wurde dabei zwischen ihrer Expression in intra- und peritumoral lokalisierten Leukozyten, sowie dem Nachweis der Moleküle in tumoralen Zellen.

Die untersuchten lytischen Effektormoleküle werden in zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen gebildet und in der zytotoxischen Immunreaktion gegen eindringende Pathogene und entartende körpereigene Zellen freigesetzt, wodurch die Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird (Rink *et al.*, 2015). Perforin bildet dabei kleine Poren in der Membran der Zielzelle, die einen Calciumeinstrom auslösen, der es den Granzymen und Granulysin ermöglicht durch Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden

(Catalfamo and Henkart, 2003; Murphy and Weaver, 2018). Dort lösen die Granzyme über verschiedene Wege die Apoptose der Zielzelle aus (Voskoboinik *et al.*, 2015; Murphy and Weaver, 2018). Während Granzym A und Granzym K den apoptotischen Zelltod unabhängig von den Caspasen auslösen indem sie die Mitochondrien schädigen, löst Granzym B eine proteolytische Caspasekaskade aus, die letztlich zum DNA-Abbau der Zielzelle führt (Rink *et al.*, 2015; Wensink *et al.*, 2016; Rudd-Schmidt *et al.*, 2019). Granulysin schädigt dagegen die äußere Mitochondrienmembran, wodurch es zur Freisetzung von Zytochrom C und weiteren apoptoseinduzierenden Faktoren kommt (Clayberger and Krensky, 2003; Sparrow and Bodman-Smith, 2020).

Die prognostische Bedeutung dieser lytischen Effektormoleküle und damit der zytolytischen Aktivität der Leukozyten in der immunologischen Tumorabwehr konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Mosconi *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019; Bisheshar *et al.*, 2020). So korreliert die Granulysin-Expression mit der Prognose und dem Progress von Tumorpatienten, insbesondere von Patienten mit nasopharyngealen Karzinomen (Kishi *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2016; Sparrow and Bodman-Smith, 2020). Es zeigte sich zudem eine Assoziation zwischen einer Einschränkung der Perforin-Funktion und der Langzeitentwicklung von malignen Tumorerkrankungen (Backes *et al.*, 2018). Auch die Granzyme scheinen eine wichtige Rolle in der antitumoralen Immunreaktion zu spielen, da ihre Expression in verschiedenen Tumorentitäten mit einer verbesserten Prognose der Patienten korreliert (Costa *et al.*, 2011). Über den Einfluss von Vitamin-D auf die lytische Aktivität der tumorinfiltrierenden Leukozyten ist allerdings bisher noch wenig bekannt, weshalb die vorliegende Arbeit den Effekt von Vitamin-D auf die Expression der lytischen Effektormoleküle untersucht.

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine positive Korrelation zwischen einem ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegel (VDA) und einer gesteigerten Expression der lytischen Effektormoleküle bei HNSCC-Patienten nachweisen. Dies war insbesondere in den intratumoral und den peritumoral lokalisierten Leukozyten zu beobachten. Im Vergleich zu Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) zeigte sich im VDA-Kollektiv eine signifikant höhere Expression von Granzym B in intratumoralen Leukozyten ($p = 0,0026$). Auch in den peritumoral lokalisierten Leukozyten war diese signifikant gesteigerte Granzym B-Expression nachzuweisen ($p = 0,0023$). Ein Überlebensvorteil für HNSCC-Patienten mit einer gesteigerten leukozytären Granzym B-Expression konnte dagegen nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Verschiedene Studien konnten aber bereits eine zentrale Bedeutung von Granzym B in der antitumoralen Immunreaktion nachgewiesen. Sie zeigten eine Assoziation zwischen einer gesteigerten Expression von Granzym B und einer verbesserten Prognose von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten (Costa *et al.*, 2010; Taghavi *et al.*, 2013; Prizment *et al.*, 2017). Dabei konnte Taghavi *et al.* speziell für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle ein verlängertes Gesamtüberleben sowie eine geringere Metastasierung in die Lymphknoten bei Patienten mit einer gesteigerten peritumoralen Granzym B-Konzentration nachweisen (Taghavi *et al.*, 2013). Eine weitere Studie untersuchte die Wirkung der Coexpression von Perforin und Granzym B auf Larynxkarzinomzellen. Hier konnte sowohl *in vitro* als

auch *in vivo* eine inhibierende Wirkung dieser Coexpression auf die Zellproliferation der Larynxkarzinomzellen festgestellt werden (Li *et al.*, 2014).

Bei der Analyse der Granzym K-Immunhistochemie konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen einer gesteigerten leukozytären Expression und einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) bestätigt werden. Dieses Ergebnis war für intratumoral lokalisierte Leukozyten ($p = 0,0240$) und auch für peritumoral lokalisierte Leukozyten ($p = 0,0276$) im Randbereich des Tumors statistisch signifikant. Auch bei Betrachtung der tumoralen Expression von Granzym K war bei den VDA-Patienten eine Tendenz zur stärkeren Expression im Vergleich zu den VDM-Patienten zu beobachten ($p = 0,1142$). In der Überlebensanalyse war ersichtlich, dass eine gesteigerte intratumorale leukozytäre Expression von Granzym K mit einem geringfügigen Überlebensvorteil einhergeht ($p = 0,1652$). Bei der peritumoral-leukozytären Granzym K-Expression war diese Tendenz jedoch nur sehr abgeschwächt nachzuweisen ($p = 0,2812$).

Bei der Betrachtung des Effektormoleküls Granzym A konnte dagegen keine Korrelation eines höheren Vitamin-D-Serumspiegels mit einer gesteigerten Granzym A-Expression nachgewiesen werden. Intratumoral zeigten die beiden Kollektive keinen deutlichen Unterschied in ihrer leukozytären Expression von Granzym A ($p = 0,7732$). Auch peritumoral konnte im VDA-Kollektiv keine signifikant gesteigerte leukozytäre Expression belegt werden ($p = 0,4933$). Ein Überlebensvorteil für HNSCC-Patienten mit einer gesteigerten leukozytären Expression von Granzym A konnte zudem nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorpatienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel zeigten eine vermehrte Perforin-Expression in peritumoral lokalisierten Leukozyten im Vergleich zu Vitamin-D-Mangel-Patienten. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p = 0,0044$). Auch die intratumoral-leukozytäre Expression von Perforin zeigte sich signifikant gesteigert im VDA-Kollektiv ($p = 0,0030$). Zudem war in den Tumorzellen der Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung eine vermehrte Expression von Perforin nachzuweisen. Auch dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p = 0,0023$). Weiterhin war zu beobachten, dass Tumorpatienten mit einer gesteigerten tumoralen Perforin-Expression ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben aufweisen im Vergleich zu solchen mit niedriger tumoraler Perforin-Expression ($p = 0,0321$). Darüber hinaus scheint eine höhere intratumoral-leukozytäre Expression von Perforin mit einem geringfügigen Überlebensvorteil bei HNSCC-Patienten assoziiert zu sein ($p = 0,2394$). In diesem Zusammenhang konnte auch eine Studie von Backes *et al.* belegen, dass bereits leichte Einschränkungen der Perforin-Funktion mit der Langzeitentwicklung von malignen Neoplasien assoziiert sind (Backes *et al.*, 2018). Außerdem zeigte sich in einer Studie die potentielle Funktion der Perforin-Expression als prognostischer Biomarker für Kopf-Hals-Karzinome, der in Zukunft klinisch genutzt werden könnte (Laytragoon-Lewin *et al.*, 2014). Weitere Studien untersuchten die zytolytische Aktivität der Leukozyten in verschiedenen Tumorentitäten und deren Bedeutung als Prognosemarker (Rooney *et al.*, 2015; Narayanan *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019). Eine Studie konnte bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Zunge bestätigen, dass

eine höhere zytolytische Aktivität in Form einer gesteigerten Expression von Perforin und Granzym A mit einem längeren progressionsfreien Überleben korreliert (Gu *et al.*, 2019). Narayanan *et al.* konnten zudem nachweisen, dass eine gesteigerte zytolytische Aktivität in kolorektalen Karzinomen mit einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ist. Außerdem zeigte sich in dieser Studie eine Assoziation zwischen einer hohen zytolytischen Aktivität und einer gesteigerten Expression von Immuncheckpointmolekülen (Narayanan *et al.*, 2018). Dies ist vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung der Immuncheckpoint-Inhibitoren in der antitumoralen Immuntherapie besonders interessant und bedarf weiterer Studien, um die Bedeutung der zytolytischen Aktivität für die Effektivität der Immuncheckpoint-Blockade zu untersuchen.

Die Auswertung der Granulysin-Immunhistochemie zeigte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und einer gesteigerten tumoralen Expression von Granulysin. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p = 0,0109$). Für die Granulysin-Expression in intratumoral lokalisierten Leukozyten konnte dagegen kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kollektiven nachgewiesen werden ($p = 0,3008$). Auch die Betrachtung der peritumoral-leukozytären Expression konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den VDA- und den VDM-Patienten belegen ($p = 0,2880$). Das Ausmaß der tumoralen und leukozytären Expression von Granulysin beeinflusste zudem das Gesamtüberleben der Kopf-Hals-Tumorpatienten nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Verschiedene Studien konnten allerdings die zytotoxische Wirkung des Granulysin gegen maligne Lymphom- und Myelomzellen nachweisen (Aporta *et al.*, 2014; Al-Wasaby *et al.*, 2015). Diese Studien untersuchten zudem die Nutzung von rekombinantem Granulysin als antitumorales Therapeutikum in immundefizienten Mäusen. Hier zeigten sich gute Resultate gegen verschiedene Tumorentitäten (Al-Wasaby *et al.*, 2015; Martinez-Lostao *et al.*, 2015; Sparrow and Bodman-Smith, 2020). Diese Beobachtung bedarf daher weiterer Forschung, welche die mögliche therapeutische Nutzung von Granulysin in der antitumoralen Immuntherapie untersucht und so deren klinische Anwendbarkeit ermöglichen könnte. In anderen Studien zeigte sich darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Granulysin-Expression und der Prognose und dem Gesamtüberleben von Tumorpatienten, insbesondere bei Patienten mit nasopharyngealen Karzinomen (Kishi *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2016; Sparrow and Bodman-Smith, 2020). Die Studie von Lin *et al.* lässt zudem darauf schließen, dass der Granulysin-Serumspiegel mit der Tumorprogression korreliert und so als möglicher Biomarker für Nasopharynxkarzinome genutzt werden könnte (Lin *et al.*, 2016).

Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass Vitamin-D nicht nur einen Einfluss auf das Infiltrationsverhalten der Leukozyten hat (Bochen *et al.*, 2018), sondern auch die Expression einiger lytischer Effektormoleküle und damit die zytolytische Aktivität der Leukozyten steigert. Vitamin-D scheint die Expression des porenbildenden Perforin zu steigern, was es letztlich den apoptoseinduzierenden Granzymen und Granulysin ermöglicht vermehrt in die malignen Tumorzellen zu gelangen. Interessanterweise scheint sich die Wirkung von Vitamin-D auf die verschiedenen Granzyme allerdings deutlich zu unterscheiden. Während die Patienten mit ausreichender Vitamin-D-

Versorgung eine gesteigerte Expression von Granzym B und Granzym K aufweisen, stellt sich die Expression von Granzym A völlig unabhängig vom Vitamin-D-Serumspiegel dar. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht darin, dass die Leukozyten je nach der Art ihrer Aktivierung die Granzyme in unterschiedlicher Zusammensetzung produzieren (Garcia-Sanz *et al.*, 1990; Ebnet *et al.*, 1995). Zudem enthalten die meisten Leukozyten lediglich Granzym A oder Granzym B, nur wenige Leukozyten exprimieren alle unterschiedlichen Granzyme zur gleichen Zeit (Russell and Ley, 2002; Chowdhury and Lieberman, 2008). Um den Effekt von Vitamin-D auf die Aktivierung der Leukozyten und auf die molekularen Expressionsmechanismen der einzelnen Effektormoleküle genauer zu eruieren sind weitere experimentelle und molekulargenetische Untersuchungen notwendig, da die Methodik der Immunhistochemie hierzu alleine nicht ausreicht.

Vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung der immunmodulatorischen Therapiestrategien in der Behandlung verschiedener Tumorentitäten (Enk *et al.*, 2000; Hodi *et al.*, 2010; Kansy *et al.*, 2015) sollte auch die potentielle therapeutische Nutzung der Granzyme in zukünftigen immunonkologischen Forschungsprojekten berücksichtigt werden. Vor allem in der Behandlung hämatologischer maligner Erkrankungen hat die Nutzung zellbasierter Immuntherapien in den letzten Jahren deutlich zugenommen. So ist es in der Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) durch den bispezifischen monoklonalen Antikörper Blinatumumab bereits möglich das zytotoxische Potential der T-Zellen gezielt auf die Tumorzelle zu richten (Topp *et al.*, 2015; Kantarjian *et al.*, 2017). Um die Wirksamkeit immunonkologischer Therapien auch in soliden Tumoren zu verbessern, untersuchte zudem eine weitere Studie die potentielle therapeutische Nutzung eines Granzym B-Transportsystems zur Unterstützung der körpereigenen zytotoxischen Immunreaktion gegen den Tumor. Qian *et al.* konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell eine stimulierende Wirkung des Granzym B-Transportsystems auf die T- und NK-Zell-vermittelte antitumorale Immunreaktion nachweisen (Qian *et al.*, 2019). Solche immunsupportive Ansätze sollten näher untersucht und weiterentwickelt werden, um die Therapie von Tumorerkrankungen mit immunsuppressiven Eigenschaften wie den HNSCCs zukünftig verbessern zu können.

Bei der Betrachtung der Überlebensdaten des analysierten Patientenkollektivs konnte insgesamt bei HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung im Vergleich zu Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von ca. 10 Monaten nachgewiesen werden ($p = 0,0188$). Dies könnte zum einen durch die signifikant gesteigerte Leukozyteninfiltration in den VDA-Patienten (Bochen *et al.*, 2018) und zum anderen durch den in dieser Arbeit nachgewiesenen Einfluss des Vitamin-D auf die zytolytische Aktivität der Leukozyten bedingt sein. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte durch eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung auch die derzeit niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 55 % in HNSCC-Patienten verbessert werden.

Letztlich wäre eine umfangreiche multivariable Datenanalyse, die ein großes und bezüglich Patientencharakteristika abgestimmtes Patientenkollektiv umfasst, notwendig um klären zu können, ob Vitamin-D einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt und inwieweit sein immunstimulierendes Potenzial von weiteren immunmodulatorischen Aspekten abhängig ist. Das in der vorliegenden Arbeit analysierte Patientenkollektiv war dazu zu klein ($n = 114$) und hinsichtlich der Patienteneigenschaften zu heterogen, um eine sinnvolle Multivarianz-Analyse zu ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten verdeutlichen zum einen den prognoseverbessernden Einfluss einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich. Zum anderen konkretisieren sie den modulierenden Effekt von Vitamin-D auf die zytolytische Aktivität der Leukozyten im Tumorgewebe. Vitamin-D fördert die Effektivität der antitumoralen Immunreaktion durch eine Steigerung der Expression lytischer Effektormoleküle, was die Suppression der Tumorzellen verstärken und damit die Tumorprogression verzögern könnte. Dabei gilt es allerdings zu beachten, dass neben den in dieser Arbeit untersuchten Effektormolekülen zahlreiche weitere Mediatoren und Zytokine in der direkten Tumorumgebung an der immunologischen Tumorabwehr beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu analysieren, inwieweit Vitamin-D das Zytokinprofil und zelluläre Mediatoren im Tumormikromilieu beeinflusst. Dazu werden derzeit an der Universität des Saarlandes in der HNO-onkologischen Forschungsabteilung zusätzliche Experimente durchgeführt, die den Einfluss von Vitamin-D auf weitere immunologische Mediatoren, wie die Interleukine, und auf weitere zytotoxische Mediatoren der NK-Zellen, wie FAS-Ligand und TRAIL, untersucht.

Zusammenfassend kann bei der Betrachtung aller bisher angeführten Aspekte und der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten festgestellt werden, dass eine ausreichend hohe Vitamin-D-Versorgung bei Kopf-Hals-Tumorpatienten zu einem deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zu HNSCC-Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel führen kann. Zudem verdeutlichen die Ergebnisse, dass Vitamin-D die Expression der lytischen Enzyme in der Tumorumgebung der HNSCCs beeinflussen und somit die zytolytische Aktivität der tumorinfiltrierenden Leukozyten regulieren kann. Daraus lässt sich schließen, dass es für Kopf-Hals-Tumorpatienten besonders vorteilhaft sein kann, auf eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung zu achten und dass auch in der klinischen Behandlung die kostengünstige Möglichkeit der Vitamin-D-Substitution berücksichtigt werden sollte. Weiterhin sind zusätzliche Experimente und Studien erforderlich, die die immunmodulatorische Potenz des Vitamin-D im Rahmen der antitumoralen Immunreaktion untersuchen. Nur so kann eruiert werden, inwieweit Vitamin-D als Verbindung zwischen der exogen-medikamentösen und der endogenen Immunmodulation fungieren und damit eine Vitamin-D-Substitution die Effektivität der Immuntherapien in der Kopf-Hals-Onkologie steigern kann, um letztlich das Gesamtüberleben und die Lebensqualität der HNSCC-Patienten zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Al-Wasaby, S. *et al.* (2015) 'In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors', *OncoImmunology*, 4(9), pp. 1–13.
2. Allemani, C. *et al.* (2015) 'Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25676887 patients from 279 population-based registries in 67 countries', *Lancet*, 385(9972), pp. 977–1010.
3. Anand, A. *et al.* (2017) 'Expression of Vitamin D receptor and Vitamin D status in patients with oral neoplasms and effect of Vitamin D supplementation on quality of life in advanced cancer treatment', *Wspolczesna Onkologia*, 21(2), pp. 145–151.
4. Ang, K. K. *et al.* (2010) 'Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer.', *The New England journal of medicine*, 363(1), pp. 24–35.
5. Aporta, A. *et al.* (2014) 'Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors', *Biochemical Pharmacology*, 87(3), pp. 410–423.
6. Arem, H. *et al.* (2011) 'Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in finnish men', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 20(6), pp. 1178–1184.
7. Autier, P. and Gandini, S. (2007) 'Vitamin D supplementation and Total Mortality', *Archives of International Medicine*, 167(16), pp. 1730–1737.
8. Backes, C. S. *et al.* (2018) 'Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms', *Journal of Biological Chemistry*, 293(42), pp. 16348–16363.
9. Badoual, C. *et al.* (2006) 'Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers', *Clinical Cancer Research*, 12(2), pp. 465–472.
10. Baeke, F. *et al.* (2010) 'Vitamin D: Modulator of the immune system', *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, 10(4), pp. 482–496.
11. Balensiefer, B. (2017) 'Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich'
12. Barnes, L., Chiosea, S. I. and Seethala, R. R. (2010) 'Head and Neck Pathology', *Demos Media Publishing*, pp. 1–18.
13. Battault, S. *et al.* (2013) 'Vitamin D metabolism, functions and needs: From science to health claims', *European Journal of Nutrition*, 52(2), pp. 429–441.

14. 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.
15. Beatty, G. L. and Gladney, W. L. (2015) 'Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy', *Clinical Cancer Research*, (10), pp. 687–693.
16. Berger, M. D. *et al.* (2018) 'A polymorphism within the Vitamin D transporter gene predicts outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI/ bevacizumab or FOLFIRI/Cetuximab', *Clinical Cancer Research*, 24(4), pp. 784–793.
17. Bergmann, C. *et al.* (2008) 'T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: Mechanisms of suppression and expansion in advanced disease', *Clinical Cancer Research*, 14(12), pp. 3706–3715.
18. Bernardi, R. J. *et al.* (2002) 'Antiproliferative Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and Vitamin D Analogs on Tumor-Derived Endothelial Cells', *Endocrinology*, 143(7), pp. 2508–2514.
19. Betiol, J., Villa, L. L. and Sichero, L. (2013) 'Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(3), pp. 217–226.
20. Biosystems, L. (2014) 'Mouse Monoclonal Antibody Perforin', *LeicaBiosystems*.
21. Bischoff-Ferrari, H. A. *et al.* (2009) 'Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults', *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(5), pp. 935–942.
22. Bishesar, S. K. *et al.* (2020) 'The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis', *OncoImmunology*. Taylor & Francis, 9(1), pp. 1–10.
23. 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*, 32(29), pp. 3242–3248.
24. Bochen, F. *et al.* (2018) 'Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients—prevalence, prognostic value and impact on immune function', *OncoImmunology*, 7(9).
25. Bonner, J. A. *et al.* (2010) 'Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival.', *The Lancet. Oncology*. England, 11(1), pp. 21–28.
26. Boonstra, A. *et al.* (2001) '1 α ,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.

27. Borel, P., Caillaud, D. and Cano, N. (2015) 'Vitamin D Bioavailability: State of the Art', *Food, Science and Nutrition*, (9).
28. Bouillon, R. *et al.* (2008) 'Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice', *Endocrine Reviews*, 29(6), pp. 726–776.
29. Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. and Wittekind, C. (2017) 'TNM Classification of Malignant Tumours', *Union for International Cancer Control (UICC)*.
30. 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.
31. Burtneß, B. *et al.* (2019) 'Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study.', *Lancet (London, England)*. England, 394(10212), pp. 1915–1928.
32. Bußmann, L., Münscher, A. and Busch, C. J. (2018) 'Treatment of head and neck squamous cell carcinoma recurrences and distant metastases: Highlights of the 2018 ASCO meeting', *Hno*, 66(12), pp. 907–912.
33. Carlberg, C. (2014) 'The physiology of vitamin D - far more than calcium and bone', *Frontiers in Physiology*, 5 AUG(September), pp. 1–2.
34. Carvalho, A. L. *et al.* (2005) 'Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database', *International Journal of Cancer*, 114(5), pp. 806–816.
35. Castellsagué, X. *et al.* (2004) 'The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis', *International Journal of Cancer*, 108(5), pp. 741–749.
36. Catalfamo, M. and Henkart, P. A. (2003) 'Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway', *Current Opinion in Immunology*, 15(5), pp. 522–527.
37. Chen, D. S. and Mellman, I. (2013) 'Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle', *Immunity*, 39(1), pp. 1–10.
38. Cheraghlou, S. *et al.* (2019) 'HPV status in unknown primary head and neck cancer: Prognosis and treatment outcomes', *Laryngoscope*, 129(3), pp. 684–691.
39. Chikamatsu, K. *et al.* (2007) 'Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.', *Head & neck*. United States, 29(2), pp. 120–127.

40. Chow, L. Q. M. *et al.* (2016) 'Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort.', *Journal of clinical oncology*, 34(32), pp. 3838–3845.
41. Chowdhury, D. and Lieberman, J. (2008) 'Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death', *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp. 389–420.
42. Clayberger, C. and Krensky, A. M. (2003) 'Granulysin', *Current Opinion in Immunology*, 15(5), pp. 560–565.
43. Cohen, E. E. W. *et al.* (2019) 'Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study.', *Lancet (London, England)*. England, 393(10167), pp. 156–167.
44. Cohen, N., Fedewa, S. and Chen, A. (2018) 'Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population', *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 30, p. 30303.
45. Cohen, R. B. (2014) 'Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).', *Cancer treatment reviews*. Netherlands, 40(4), pp. 567–577.
46. Concu, R. and Cordeiro, M. N. D. S. (2018) 'Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer.', *Current topics in medicinal chemistry*. United Arab Emirates, 18(3), pp. 192–198.
47. Costa, N. L. *et al.* (2010) 'The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 46(3), pp. 185–189.
48. Costa, N. L. *et al.* (2011) 'Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma', *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 40(5), pp. 380–384.
49. Cowell, J. K. (2001) 'Molecular Genetics of Cancer', *Gulf Professional Publishing*.
50. Dankers, W. *et al.* (2017) 'Vitamin D in autoimmunity: Molecular mechanisms and therapeutic potential', *Frontiers in Immunology*, 7.
51. Dasgupta, S. *et al.* (2005) 'Inhibition of NK Cell Activity through TGF- β 1 by Down-Regulation of NKG2D in a Murine Model of Head and Neck Cancer', *The Journal of Immunology*, 175(8), pp. 5541–5550.
52. Doorbar, J. *et al.* (2012) 'The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 30, pp. F55–F70.
53. Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. (2005) 'Vitamin D', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 289, pp. 8–28.

54. Ebnet, K. *et al.* (1995) 'Transcription of granzyme a and b genes is differentially regulated during lymphoid ontogeny', *Journal of Experimental Medicine*, 181(2), pp. 755–763.
55. Enk, A. H. *et al.* (2000) 'High dose inhalation interleukin-2 therapy for lung metastases in patients with malignant melanoma.', *Cancer*. United States, 88(9), pp. 2042–2046.
56. 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*. United States, 100(4), pp. 261–269.
57. 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*. Nature Publishing Group, 6(October), pp. 1–11.
58. Ferlay, J. *et al.* (2019) 'Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.', *International journal of cancer*. United States, 144(8), pp. 1941–1953.
59. Ferris, R. L. (2015) 'Immunology and immunotherapy of head and neck cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), pp. 3293–3304.
60. 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.
61. Gaber, E. and Wildner, M. (2011) 'Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede', *Robert Koch Institut*, 32(2), p. 56.
62. Garcia-Sanz, J. A. *et al.* (1990) 'Cell specificity of granzyme gene expression', *The Journal of Immunology*, 145(9), pp. 3111–3118.
63. Garland, C. F. *et al.* (2006) 'The role of vitamin D in cancer prevention', *American Journal of Public Health*, 96(2), pp. 252–261.
64. Gerlinger, M. *et al.* (2012) 'Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing', *The New England Journal of Medicine*, 366.
65. Giovannucci, E. *et al.* (2006) 'Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(7), pp. 451–459.
66. Gu, X. *et al.* (2019) 'High immune cytolytic activity in tumor-free tongue tissue confers better prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue', *Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(4), pp. 240–247.

67. 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.
68. Guidi, A. *et al.* (2020) 'Autoimmune-related encephalitis during treatment with nivolumab for advanced head and neck cancer: a case report and literature review.', *Tumori*. United States.
69. Hashibe, M. *et al.* (2007) 'Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.', *Journal of the National Cancer Institute*. United States, 99(10), pp. 777–789.
70. Hashibe, M. *et al.* (2015) '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 Biomarkers and Prevention*, 33(0), pp. 541–550.
71. Heaney, R. P. (2012) 'Vitamin D - Baseline status and effective dose', *New England Journal of Medicine*, 367(1), pp. 77–78.
72. Heaney, R. P. and *et al.* (2003) 'Calcium Absorption Varies within the Reference Range for Serum 25-Hydroxyvitamin D', *Journal of American College Nutrition*, pp. 142–146.
73. 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.
74. Hochmann, J. *et al.* (2020) 'Human papillomavirus type 18 e5 oncoprotein cooperates with e6 and e7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, pp. 1–11. 5.
75. Hodi, F. S. *et al.* (2010) 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma', *New England Journal of Medicine*, 363(8), pp. 711–723.
76. Hof, H. and Dörries, R. (2017) *Medizinische Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag.
77. Hoffmann, P. *et al.* (2005) 'Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct', *International Journal of Cancer*, 115(1), pp. 98–104.
78. Holick, M. F. (2004) 'Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis', *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3), pp. 362–371.
79. Holick, M. F. (2007) 'Vitamin D deficiency', *The New England Journal of Medicine*, pp. 266–281.

80. Holick, M. F. (2009) 'Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application', *Annals of Epidemiology*, 23(1), pp. 1–7.
81. Holick, M. F. *et al.* (2011) 'Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(7), pp. 1911–1930.
82. Holick, M. F. (2013) 'Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults', *New England Journal of Medicine*, 369(21), pp. 2047–2048.
83. Holick, M. F. (2016) 'Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and Vitamin D for health', *Anticancer Research*, 36(3), pp. 1345–1356.
84. Holick, M. F. (2017) 'The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(2), pp. 153–165.
85. Kaatsch, P. and Spix, C. (2019) 'Krebs in Deutschland für 2015 / 2016', *Robert Koch Institut*, 112.
86. Kansy, B. *et al.* (2015) 'Immuntherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen', *Hno*, 63(11), pp. 797–803.
87. Kantarjian, H. *et al.* (2017) 'Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia', *New England Journal of Medicine*, 376(9), pp. 836–847.
88. Keegan, R. J. H. *et al.* (2013) 'Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans', *Dermato-Endocrinology*, 5(1), pp. 165–176.
89. Kimple, A. J. *et al.* (2012) 'HPV-associated head and neck cancer: Molecular and nano-scale markers for prognosis and therapeutic stratification', *Sensors*, 12(4), pp. 5159–5169.
90. Kishi, A. *et al.* (2002) 'Differential expression of granulysin and perforin by NK cells in cancer patients and correlation of impaired granulysin expression with progression of cancer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50(11), pp. 604–614.
91. Kongsbak, M. *et al.* (2014) 'Vitamin D up-regulates the vitamin D receptor by protecting it from proteasomal degradation in human CD4+ T cells', *PLoS ONE*, 9(5).
92. Laban, S. *et al.* (2015) 'Immuntherapie von Kopf-Hals-Karzinomen: Highlights des ASCO-Kongresses 2015', *Hno*, 63(9), pp. 612–619.
93. Lampert, T., Hoebel, J. and Kroll, L. E. (2019) 'Journal of Health Monitoring', *Journal of Health Monitoring Robert Koch Institut*, 12(2), pp. 26–30.
94. Layman, H. *et al.* (2020) 'Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous quantification of type-specific IgG antibodies to E6 / E7 oncoproteins of HPV16 and HPV18', *Public Library of Science (PLOS ONE)*, pp. 1–19.

95. Laytragoon-Lewin, N. *et al.* (2014) 'Perforin, CD28 and CD95 expression in circulating CD4 and CD8 cells as predictors of head and neck (H&N) cancer patient survival', *Medical Oncology*, 31(12), pp. 1–5.
96. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. and Brakenhoff, R. H. (2011) 'The molecular biology of head and neck cancer.', *Nature reviews. Cancer*. England, 11(1), pp. 9–22.
97. Lewis, A. *et al.* (2015) 'The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic.', *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. United States, 29(9), pp. 616–626.
98. Li, X. Y. *et al.* (2014) 'Co-expression of perforin and granzyme B genes induces apoptosis and inhibits the tumorigenicity of laryngeal cancer cell line Hep-2', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(3), pp. 978–986.
99. Lin, J. *et al.* (2016) 'Evaluation of serum granulysin as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 454, pp. 72–76.
100. Linxweiler, M. and Schick, B. (2015) 'Reply to 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*. United States, pp. 382–383.
101. Löffler, A. *et al.* (2003) 'Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct', *Leukemia*, 17(5), pp. 900–909.
102. Löffler, G. and Petrides, P. E. (2013) *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Verlag.
103. 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.
104. Lopez Payares, G. M. and Ali, F. A. (2015) 'Vitamin D deficiency', *The 5-Minute Clinical Consult Standard 2016: Twenty Fourth Edition*, pp. 266–281.
105. Lubin, J. H. *et al.* (2007) 'Cigarette smoking and cancer risk: modeling total exposure and intensity.', *American journal of epidemiology*. United States, 166(4), pp. 479–489.
106. Lubin, J. H. *et al.* (2009) 'Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: A pooled analysis of case-control studies', *American Journal of Epidemiology*, 170(8), pp. 937–947.
107. Ma, Y. *et al.* (2008) '1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), pp. 3047–3055.

108. Machiels, J.-P. *et al.* (2020) ‘Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.’, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. England, pp. 1462–1475.
109. Mandal, R. *et al.* (2016) ‘The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications’, *JCI Insight*, 1(17), pp. 1–18.
110. Manson, J. A. E. *et al.* (2019) ‘Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease’, *New England Journal of Medicine*, 380(1), pp. 33–44.
111. Mantell, D. J. *et al.* (2000) ‘1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Angiogenesis In Vitro and In Vivo’, *Growth Factors*, pp. 214–220.
112. Martinez-Lostao, L. *et al.* (2015) ‘Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities.’, *Immunotherapy*. England, 7(8), pp. 882–883.
113. Mehra, R. *et al.* (2020) ‘Real-world treatment patterns for patients with metastatic head and neck squamous cell carcinoma treated with immuno-oncology therapy’, *Head and Neck*, 42(8), pp. 2030–2038.
114. Meier, J. D. *et al.* (2007) ‘Treatment with 1- α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (vitamin D₃) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model’, *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 133(11), pp. 1149–1152.
115. 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.
116. Michaud, D. S. *et al.* (2014) ‘High-risk HPV types and head and neck cancer’, *International Journal of Cancer*, 135(7), pp. 1653–1661.
117. 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.
118. Mora, J. R., Iwata, M. and Andrian, U. H. Von (2008) ‘Vitamin effects on the immune system’, *Nature Review Immunology*, 8(9), pp. 685–698.
119. Moretta, L. *et al.* (2002) ‘Human natural killer cells: Their origin, receptors and function’, *European Journal of Immunology*, 32(5), pp. 1205–1211.
120. Mosconi, C. *et al.* (2017) ‘Immunohistochemical investigations on the expression of programmed cell death ligand 1, human leukocyte antigens G and E, and granzyme B in intraoral mucoepidermoid carcinoma’, *Archives of Oral Biology*. Elsevier, 83(July), pp. 55–62.

121. Moukayed, M. and 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 and Metabolic Disorders*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(2), pp. 167–182. d
122. Murphy, K. M. and Weaver, C. (2018) *Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum.
123. Narayanan, S. *et al.* (2018) 'Cytolytic Activity Score to Assess Anticancer Immunity in Colorectal Cancer', *Annals of Surgical Oncology*. Springer International Publishing, 25(8), pp. 2323–2331.
124. Nnoaham, K. E. and Clarke, A. (2008) 'Low serum vitamin D levels and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis', *International Journal of Epidemiology*, 37(1), pp. 113–119.
125. Orell-Kotikangas, H. *et al.* (2012) 'High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis', *Head and Neck*. 36(10), p. 1391.
126. Pilz, S. *et al.* (2009) 'Epidemiology of vitamin D insufficiency and cancer mortality', *Anticancer Research*, 29(9), pp. 3699–3704.
127. Prietl, B. *et al.* (2013) 'Vitamin D and immune function', *Nutrients*, 5(7), pp. 2502–2521.
128. Prizment, A. E. *et al.* (2017) 'Cytotoxic t cells and granzyme b associated with improved colorectal cancer survival in a prospective cohort of older women', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 26(4), pp. 622–631.
129. Qian, X. *et al.* (2019) 'A novel Granzyme B nanoparticle delivery system simulates immune cell functions for suppression of solid tumors', *Theranostics*, 9(25), pp. 7616–7627.
130. Raja, S. M., Metkar, S. S. and Froelich, C. J. (2003) 'Cytotoxic granule-mediated apoptosis: Unraveling the complex mechanism', *Current Opinion in Immunology*, 15(5), pp. 528–532.
131. Ramos, M., Benavente, S. and Giralt, J. (2010) 'Management of squamous cell carcinoma of the head and neck: updated European treatment recommendations.', *Expert review of anticancer therapy*. England, 10(3), pp. 339–344.
132. Ramqvist, T. and Dalianis, T. (2010) 'Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus', *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), pp. 1671–1677.
133. Reiß, M. *et al.* (2009) *Facharztwissen HNO-Heilkunde Differenzierte Diagnostik und Therapie*.
134. 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.' *Pathologe* 8, 138-140

135. Rink, L., Kruse, A. and Haase, H. (2015) *Immunologie für Einsteiger*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
136. Rivera, C. (2015) 'Essentials of oral cancer', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), pp. 11884–11894.
137. Robert Koch-Institut (2016) 'Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016'.
138. Rooney, M. S. *et al.* (2015) 'Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity', *Cell*, 160(1–2), pp. 48–61.
139. Rudd-Schmidt, Jesse A Trapani, J. A. and Voskoboinik, I. (2019) 'Distinguishing Perforin-Mediated Lysis and Granzyme-Dependent Apoptosis', *Methods Enzymol*, pp. 291–306.
140. Russell, J. H. and Ley, T. J. (2002) 'Lymphocyte-mediated cytotoxicity', *Annual Review of Immunology*, 20(6), pp. 323–370.
141. Russell, S. M. *et al.* (2011) 'USC-HN2, a new model cell line for recurrent oral cavity squamous cell carcinoma with immunosuppressive characteristics', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 47(9), pp. 810–817.
142. Saini, R. V. *et al.* (2011) 'Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells', *The Journal of Immunology*, 186(6), pp. 3497–3504.
143. Satake, K. *et al.* (2003) 'Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma', *Auris Nasus Larynx*, 30(4), pp. 403–412.
144. Schadendorf, D. (no date) 'Auf dem Weg zum Standard beim Melanom', *Deutsches Ärzteblatt*, pp. 1–3.
145. Schelhase, T. and Weber, S. (2007) 'Die Todesursachenstatistik in Deutschland', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 50(7), pp. 969–976.
146. Schmoll, H.-J., Höffken, K. and Possinger, K. (2013) *Kompendium Internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
147. Van Schoor, N. M. and Lips, P. (2011) 'Worldwide vitamin D status', *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Ltd, 25(4), pp. 671–680.
148. 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.

149. Sesterhenn, A. M. *et al.* (2005) 'Head and neck cancer in the elderly: A cohort study in 40 patients', *Acta Oncologica*, 44(1), pp. 59–64.
150. Simpson, S. *et al.* (2010) 'Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 68(2), pp. 193–203.
151. Sparrow, E. and Bodman-Smith, M. D. (2020) 'Granulysin: The attractive side of a natural born killer', *Immunology letters*. Elsevier, 217(October 2019), pp. 126–132.
152. Taghavi, N., Khaleghjou, A. and Mahdavi, N. (2013) 'Correlation of P53 and granzyme B expression in oral squamous cell carcinoma with clinicopathologic findings', *Archives of Iranian Medicine*, 16(9), pp. 498–502.
153. Teymoortash, A. and Werner, J. A. (2012) 'Aktuelle Fortschritte in der Diagnostik und chirurgischen Therapie der Halslymphknoten- metastasen bei Kopf-Hals-Karzinomen Current Advances in Diagnosis and Surgical Treatment of Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer', *Laryngo-Rhino-Otologie*, 91(6), pp. 102–122.
154. Topp, M. S. *et al.* (2015) 'Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: A multicentre, single-arm, phase 2 study', *The Lancet Oncology*, 16(1), pp. 57–66.
155. Toubi, E. and Shoenfeld, Y. (2010) 'The role of vitamin D in regulating immune responses', *Israel Medical Association Journal*, 12(3), pp. 174–175.
156. 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. 1095–1110.
157. Vieth, R. (2007) 'Vitamin D toxicity, policy, and science', *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(SUPPL. 2), pp. 64–68.
158. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. and Trapani, J. A. (2015) 'Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(6), pp. 388–400.
159. Wacker, M. and Holick, M. F. (2013) 'Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health', *Dermato-Endocrinology*, 5(1), pp. 51–108.
160. Walker, D. D. *et al.* (2012) 'Immunological modulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D 3 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck', *Cytokine*, 58(3), pp. 448–454.
161. Walsh, J. E. *et al.* (2010) 'Use of α ,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma', *Human Immunology*.

162. Weber, J. S. *et al.* (2015) 'Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial.', *The Lancet. Oncology*. England, 16(4), pp. 375–384.
163. Wensink, A. C. *et al.* (2016) 'Granzyme M and K release in human experimental endotoxemia', *Immunobiology*. Elsevier GmbH., 221(7), pp. 773–777.
164. Wiegand, S. *et al.* (2015) 'Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen von Mundhöhle, Rachen und Kehlkopf', *Hessisches Ärzteblatt*.
165. Wild, C. A. *et al.* (2010) 'Toll-like receptors in regulatory T cells of patients with head and neck cancer', *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 136(12), pp. 1253–1259.
166. Wittekind, C. and Oberschmid, B. (2010) 'TNM-klassifikation maligner tumoren 2010. Allgemeine aspekte und änderungen im allgemeinen teil', *Der Pathologe*, 31(5), pp. 333–338.
167. Wolff, K.-D. *et al.* (2012) 'Mundhöhlenkarzinom Therapie Kurzversion', *Onkologie Leitlinienprogramm*, (007), pp. 1–38.
168. Wolff, K.-D., Follmann, M. and Nast, A. (2012) 'The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer', *Deutsches Aerzteblatt Online*, 109(November).
169. Wollenberg, B. (2019) 'PD-1 antibodies in head-and-neck cancer.', *Lancet (London, England)*. England, 393(10167), pp. 108–109.
170. World Health Organization (2016) 'Global Deaths 2000-2016'.
171. World Health Organization (2017) 'Global Burden of Disease Study 2017', *The Lancet*, pp. 1–7.
172. World Health Organization (2018) 'The top 10 causes of death'.
173. Wu, C. H. *et al.* (2019) 'Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells', *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1).
174. Wu, H. *et al.* (2018) 'Apatinib plus radiotherapy or not in chemotherapy-refractory recurrent or metastatic oral squamous cell carcinoma: A pilot study.', *Journal of Clinical Oncology*, 36(15_suppl), pp. e18101–e18101.
175. Yokota, T. *et al.* (2020) 'A real-world clinical outcomes and prognostic factors in Japanese patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck treated with chemotherapy plus cetuximab: A prospective observation study (JROSG12-2)', *Annals of Oncology*. Springer Singapore, 31(0123456789), pp. S678–S679.
176. Yokota, Tomoya *et al.* (2020) 'Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck', *Japanese journal of clinical oncology*, 50(10), pp. 1089–1096.

177. Young, M. R. I. and Day, T. A. (2013) 'Immune regulatory activity of vitamin D3 in head and neck cancer', *Cancers*, pp. 1072–1085.
178. Yu, S. and 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.
179. Yuzefpolskiy, Y. *et al.* (2014) 'Vitamin D Receptor Signals Regulate Effector and Memory CD8 T Cell Responses to Infections in Mice', *The Journal of Nutrition*, 25, pp. 2073–2082.
180. Zalewska, M. *et al.* (2009) 'History of cigarette smoking. The effect of tobacco smoking on women's health', *Przegl Lek.*
181. Zella, J. B., McCary, L. C. and DeLuca, H. F. (2003) 'Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417(1), pp. 77–80.
182. 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.
183. Zittermann, A. *et al.* (2012) 'Safety Issues of Vitamin D Supplementation', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(1), pp. 4–10.
184. Zumbach, K. *et al.* (2000) 'Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma', *International Journal of Cancer*, 85(6), pp. 815–818.

7. Publikationen

Poster:

Feld J, Bochen F, Wagner M, Schick B, Linxweiler M. Einfluss von Vitamin-D auf die lytische Signatur tumorinfiltrierender Leukozyten bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.

*Angenommen als Poster mit Vortrag für die DGHNO-Jahrestagung 2020, 20. Bis 23. Mai 2020, Berlin
Aufgrund der aktuellen Covid-19-Lage als digitales Poster publiziert*

8. Lebenslauf

9. Danksagung

Das Verfassen dieser wissenschaftlichen Arbeit wäre mir ohne die Hilfsbereitschaft und Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick und Herrn Prof. Dr. Alessandro Bozzato (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Möglichkeit danken, meine Arbeit an ihrer Klinik schreiben zu dürfen, für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft sowie für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für das Überlassen des überaus interessanten Themas, die ausgezeichnete Unterstützung bei meiner Arbeit, die jederzeit offene Diskussionsbereitschaft und sehr schnelle Hilfe im Falle einer Frage sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Florian Bochen M.Sc. (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für seine herausragende Betreuung bedanken, der durch sein persönliches Engagement sowie seine ausgezeichnete Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Jederzeit gewährte er mir ein offenes Ohr und außerordentlich sachkundige und erfahrene Ratschläge zum wissenschaftlichen Arbeiten. Auch die freundliche und stets geduldige Bereitschaft, mir Einblicke in verschiedene Aspekte der Molekularbiologie zu ermöglichen, will ich dankbar anerkennen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde möchte ich mich für die kollegiale Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre während des Laboralltags bedanken. Insbesondere Frau Monika Hoffmann, Frau Ulrike Bechtel und Frau Carolin Bick danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft während der Etablierung und den Versuchen.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Rainer Bohle, Herrn PD Dr. Matthias Wagner sowie Frau Elke Stenzhorn-Niemann (Klinik für Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Kooperation und die Bereitstellung der Gewebeblöcke, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

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