

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

Geschlechterspezifische Bedeutung von HLA-E und seiner löslichen Form für Patientinnen und Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom

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

Homburg/Saar 2024

vorgelegt von Anne Radermacher
geb. am 10.01.1997 in Kaiserslautern

Tag der Promotion: 16.09.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sandra Iden

Für Philipp

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1 Zusammenfassung	8
1.1 Zusammenfassung	8
1.2 The sex-specific significance of HLA-E and its soluble form for patients with Oral Squamous Cell Carcinoma	9
2 Einleitung	11
2.1 Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich	11
2.1.1 Therapie	13
2.1.2 Prognose	14
2.2 Humane Leukozytenantigene	17
2.3 HLA-E	19
2.3.1 Funktion von HLA-E in Tumoren	19
2.3.2 HLA-E – T-Zell-Interaktion	20
2.3.3 HLA-E – NK-Zell-Interaktion	21
2.4 Lösliche HLA-Moleküle	23
2.4.1 Funktion von sHLA und sHLA-E	23
2.4.2 Regulation von sHLA-E	24
2.5. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort	25
2.5.1 Ablauf Immunantwort	25
2.5.2 Geschlechterspezifischer Unterschied in der angeborenen und erworbenen Immunantwort	26
2.5.3 Unterschiede in der Wirksamkeit von ICBs zwischen Männern und Frauen	27
2.6 Zielsetzung	28
3 Patienten und Methodik	29
3.1 Ethikanträge	29
3.1.1 Ethikantrag Gewebe-Mikroarray	29
3.1.2 Ethikantrag Enzyme linked Immunosorbend Assay	29
3.2 Versuchsaufbau	30
3.2.1 Aufbau und Analyse eines Gewebe-Mikroarrays	30
3.2.2 Vorgehen und Analyse eines Enzyme linked Immunosorbend Assay	30
3.3 Gewebe-Mikroarray	31
3.3.1 Methode	31
3.3.2 Auswahl von Patienten und Gewebe	32
3.3.3 Herstellung eines Gewebe-Mikroarrays	32
3.3.4 Schneiden der Gewebe-Mikroarrays	33
3.4 Immunhistochemie	34
3.4.1 Methode	34
3.4.2 Durchführung	34
3.4.3 Auswertung	36

3.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	40
3.5.1	Methode	40
3.5.2	Sandwich-ELISA	40
3.5.3	Blutproben	41
3.5.4	Durchführung	41
3.5.5	Auswertung	45
3.6	Statistische Analyse	48
3.7	Material	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Gewebe-Mikroarray	49
4.1.1	Klinische und histopathologische Parameter der Patientenkohorte	49
4.1.2	Die Variable „HLA-E hoch“	51
4.1.3	Korrelation zwischen der HLA-E Expression und den klinischen Parametern	53
4.1.4	Einfluss der HLA-E Expression auf das progressionsfreies- und Gesamtüberleben	55
4.1.5	Multivariate Analyse des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens	57
4.2	ELISA	59
4.2.1	Klinische Parameter der prospektiven Patientenkohorte	59
4.2.2	Geschlechterspezifische Untersuchung der HLA-E Konzentration in der Tumor- und Kontrollgruppe	62
4.2.3	Geschlechterspezifische Untersuchung der sHLA-E Konzentration in der Tumorgruppe	64
4.2.4	Korrelation zwischen der sHLA-E Konzentration und den klinischen Parametern in der Tumor- und Kontrollgruppe	64
4.2.5	Vergleich der sHLA-E Konzentration zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe	66
5	Diskussion	70
5.1	Methodenauswahl und Grenzen	71
5.2	HLA-E Expression als geschlechtsunabhängiger prognostischer Marker	73
5.3.	Soluble HLA-E ist in der Kontrollgruppe signifikant höher nachweisbar als in der Tumorgruppe	74
5.4	HLA-E Expression und sHLA-E Konzentration sind unabhängig voneinander	76
5.5	sHLA-E als prognostischer Marker für Patienten mit OSCC	77
5.6	Auswirkungen der sHLA-E Konzentrationen auf die Tumorgenese und den Gesamtorganismus geschlechterspezifisch betrachtet	79
5.7	Mögliche Konsequenzen geschlechterspezifischer Immununterschiede auf die Therapie von OSCC	81
6	Literaturverzeichnis	83
7	Tabellarischer Anhang	92
8	Eigene Veröffentlichungen	95
9.	Danksagung	96
10.	Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD94/NKG2-Rezeptoren	Rezeptorkomplex auf den Natürlichen Killerzellen
Cis	Carcinoma in situ
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatische Retikulum
FDA	Food and Drug Administration
5 FU	5-Flourouracil
HE	Hämatoxylin Eosin
HLA-E	HLA-Klasse-I-Histokompatibilitätsantigen, α -Kette E
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
KIR	Killerzell-Immunglobulin ähnlichen Rezeptors
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMPs	Matrixmetalloprotease
ND	Neck dissection
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OD	Optical density
OS	Overall survival
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
P53	Tumorsuppressorgen
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PFS	Progression free survival
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCR	Spearman's Rank Korrelation

sHLA-E	Gelöstes HLA-E
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMA	Gewebe Mikroarray
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Orale Plattenepithelkarzinome (OSCC) gehören zu den häufigsten Tumorentitäten weltweit. Trotz Bemühungen in der Forschung und der Therapie ist die Prognose weiterhin schlecht. Ein gesondertes Interesse der Forschung liegt seit einigen Jahren auf dem besseren Verständnis sogenannter „Immun escape“ Mechanismen, durch die sich der Tumor einer adäquaten Immunantwort entziehen kann. Ein bekannter Mechanismus, der nicht nur von Tumorzellen verwendet wird, ist die vermehrte Oberflächenexpression von Humanen Leukozytenantigen Klasse I, E (HLA-E), das über die Bindung des inhibitorischen Natural killer group 2A (NKG2A) Rezeptorkomplexes auf den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) deren Aktivität hemmt. Die Hemmung dieser und weiterer immunsupprimierender Achsen zur verbesserten Tumorkontrolle ist seit einigen Jahren Bestandteil der Forschung. Die Wirksamkeit von Medikamenten wie dem Anti-NKG2A Antikörper Monalizumab oder dem Programmed cell death protein (PD) Rezeptorblocker Pembrolizumab wird bereits in klinische Studien untersucht. Obwohl diese Immuncheckpoint-Hemmer einen vielversprechenden Therapieansatz in der Therapie von Krebserkrankungen darstellen, profitieren aktuell nur ca. 20 % der behandelten Patienten von diesem Therapieansatz. Interessanterweise lassen sich auch geschlechterspezifische Unterschiede in der Ansprechrate feststellen. In der vorliegenden Studie wurden insbesondere geschlechterspezifische Unterschiede in der HLA-E Expression sowie in der sHLA-E Konzentration im Blutserum von OSCC Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht.

Hierfür wurde sich für die immunhistochemische Färbung eines Gewebe-Mikroarrays mit einem HLA-E Antikörper entschieden. Als etablierte Methode bietet sie die Möglichkeit einer guten Beurteilbarkeit der HLA-E Expression auf dem untersuchten Gewebe bei einem gleichzeitig geringen Materialaufwand. Durch einen HLA-E spezifischen ELISA wurde die Konzentration des im Blutserum gelösten HLA-E bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen konnten zeigen, dass eine hohe HLA-E Expression mit aggressiven Tumoren assoziiert ist. Eine hohe HLA-E-Oberflächenexpression konnte außerdem als ein

geschlechtsunabhängiger prädiktiver Marker für ein schlechteres OS und PFS für Patienten mit OSCC bestätigt werden. Im Gegensatz zur Oberflächen-HLA-E Expression zeigte sich bei der Betrachtung der gelösten HLA-E Konzentration kein Zusammenhang zwischen selbiger und der Tumoraggressivität. Allerdings zeigte sich ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen den sHLA-E Konzentrationen von Männern und Frauen in der Tumorguppe. Dies wurde als ein Hinweis darauf gewertet, dass das Immunsystem von Männern und Frauen unterschiedlich auf die Genese oraler Plattenepithelkarzinome reagiert. Obwohl die sHLA-E Konzentration alleine nicht aussagekräftig genug ist, um aus ihr eine geschlechterspezifische Adaptation der immuntherapeutischen Therapieregime ableiten zu können, sollte die geschlechterspezifische Betrachtung immunologischer Marker in weiteren Studien stärker fokussiert werden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass das Immunsystem von Männern und Frauen in seiner Grundaktivität sowie in der Bekämpfung von Pathologien Unterschiede aufweist, müssen Studien geschlechtsdifferenziert durchgeführt werden. Dies erscheint besonders dann notwendig, wenn immunologische Marker untersucht werden. Ein besseres Verständnis einer geschlechterspezifischen Immunität bildet die Grundlage, um Therapieregime geschlechtsadaptiert gestalten und Patienten beider Geschlechter eine optimale Therapieoption bieten zu können.

1.2 The sex-specific significance of HLA-E and its soluble form for patients with Oral Squamous Cell Carcinoma

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common tumor entities worldwide. Despite efforts in research and therapy, the prognosis remains poor. For some years now, research has been particularly interested in gaining a better understanding of so-called "immune escape" mechanisms, through which the tumor can evade an adequate immune response. One known mechanism, which is not only used by tumor cells, is the increased surface expression of the Human leukocyte antigen class I, E (HLA-E), which inhibits the activity of Natural Killer cells (NK cells) by binding to the inhibitory Natural killer group 2A (NKG2A) receptor complex. The inhibition of this and other immunosuppressive axes to improve tumor control has been part of research for several years. The efficacy of drugs such as the anti-NKG2A antibody Monalizumab or the Programmed cell death protein (PD) receptor blocker Pembrolizumab is already being investigated in clinical trials. Although these immune checkpoint inhibitors represent a promising therapeutic approach in the treatment of cancer, only around 20 % of treated patients currently benefit from this therapeutic approach. Interestingly, there

are also gender-specific differences in the response rate. In the present study, gender-specific differences in HLA-E expression and sHLA-E concentration in the blood serum of OSCC patients and a healthy control group were investigated.

For this purpose, immunohistochemical staining of a tissue microarray with an HLA-E antibody was chosen. As an established method, it offers the possibility of a good assessment of the HLA-E expression on the examined tissue with a low material expenditure at the same time. An HLA-E specific ELISA was used to determine the concentration of HLA-E dissolved in the blood serum.

The results of the investigations showed that high HLA-E expression is associated with aggressive tumors. High surface HLA-E expression was also confirmed as a gender-independent predictive marker for poorer OS and PFS for patients with OSCC. In contrast to surface HLA-E expression, there was no correlation between the dissolved HLA-E concentration and tumor aggressiveness. However, there was a significant gender-specific difference between the sHLA-E concentrations of men and women in the tumor group. This was interpreted as an indication that the immune systems of men and women react differently to the genesis of oral squamous cell carcinomas. Although the sHLA-E concentration alone is not meaningful enough to derive a gender-specific adaptation of the immunotherapeutic treatment regimen, the gender-specific consideration of immunological markers should be given greater focus in further studies. Particularly in view of the fact that the immune system of men and women differs in its basic activity and in the fight against pathologies, studies must be conducted in a gender-differentiated manner. This seems particularly necessary when immunological markers are investigated. A better understanding of gender-specific immunity forms the basis for designing therapy regimes that are gender-adapted and offering patients of both sexes an optimal therapy option.

2 Einleitung

2.1 Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich

Bösartige Neubildungen im Kopf-Halsbereich gehören zu den häufigsten Tumorentitäten weltweit. In Deutschland wurden 2019 14.104 Neuerkrankungen und 5.367 Todesfälle durch das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts (RKI) dokumentiert. Männer erkranken dabei mehr als doppelt so oft wie Frauen an Tumoren des Kopf-Halsbereichs. Der bundesweite Vergleich zeigt, dass im Saarland die Anzahl an Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in der männlichen Bevölkerung die höchste in ganz Deutschland ist (110).

Tumoren des Kopf-Halsbereichs umfassen Neubildungen der Mundhöhle, des Pharynx und das Larynx. Bei den Frauen ist annähernd die Hälfte der Tumoren in der Mundhöhle oder den Lippen lokalisiert. Bei den Männern entfallen ca. ein Drittel der Kopf-Halstumoren auf diese Region. 90% der Tumoren im Kopf-Halsbereich sind Plattenepithelkarzinome, die von der Mukosa der Mundhöhle ausgehen. Laut RKI beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Tumoren des Kopf-Halsbereichs bei den Frauen 62% und bei Männern 52% (Tabelle 1). Ein möglicher Grund hierfür ist der Noxenabusus: Frauen weisen einen geringeren Anteil an durch Nikotin- und Alkoholabusus begünstigte Tumoren auf als Männer, die mit einer schlechteren Überlebensaussicht assoziiert sind. Darüber hinaus werden bei Frauen jeder 3. in einem frühen UICC-Stadium diagnostiziert, während es bei den Männern nur jeder 4. Tumor ist.

Tabelle 1: Epidemiologische Daten zu Kopf-Halstumoren für Deutschland („Krebs in Deutschland“ des Robert-Koch-Instituts)

	2017		2018		2019	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
<i>Neuerkrankungen</i>	4.560	9.800	4.490	9.820	4.470	9.634
<i>Mittleres Erkrankungsalter</i>	66	63	66	64	66	64
<i>Sterbefälle</i>	1.402	3.963	1.442	3.970	1.479	3.888
<i>Absolute 5-Jahres-Überlebensrate</i>	55 (54-61) %	46 (44-49) %	62 %	52 %		

Zu den Hauptrisikofaktoren zur Entstehung von Kopf-Halstumoren zählen der Nikotin- und der Alkoholabusus (51). Insbesondere die Kombination beider Noxen steigert das Erkrankungsrisiko deutlich. Auch die humanpathogenen Papillomaviren (HPV), insbesondere der Hochrisikotypen 16, begünstigen die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich, wobei oropharyngeal lokalisierte Tumoren deutlich häufiger betroffen sind als Tumoren der Mundhöhle (81, 51). Dabei ist ein HPV-Nachweis ein prognostisch günstiger Faktor: Patienten mit einem HPV-positiven oropharyngealen Tumor weisen ein besseres Gesamtüberleben auf als Patienten mit einem HPV-negativen oropharyngealen Tumor (91). Auch andere virale Infektionen stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Kopf-Halstumoren: Eine Epstein-Bar-Virus-Infektion (EBV) ist eine der häufigsten Ursachen für Tumoren des Nasopharynx (102).

Neben dem Noxenabusus und viralen Infektionen stellt auch das Alter einen zunehmend relevanten Risikofaktor dar (76). Durch die demographische Entwicklung unsere Bevölkerung erkranken immer mehr Menschen im fortgeschrittenen Alter an bösartigen Neubildungen des Kopf-Halsbereichs. Während von den klassischen Risikofaktoren-assoziierten Tumoren vornehmlich Männer betroffen sind, kommen altersassoziierte Tumoren vermehrt bei Frauen unabhängig von den klassischen Noxen vor (76).

2.1.1 Therapie

Die Konzepte zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich haben sich im letzten Jahrhundert stetig weiterentwickelt. Während in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts Plattenepithelkarzinome vornehmlich durch eine primäre Strahlentherapie behandelt wurden, führten Weiterentwicklungen in der perioperativen Versorgung und die Wahrnehmung eines breiten Nebenwirkungsspektrums der Strahlentherapie in den 1950er Jahren zu einem vermehrt primär chirurgischen Therapieansatz. Auch heute kommt die Radiotherapie, meist als adjuvantes Konzept in Kombination mit Chemotherapeutika, bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs zum Einsatz (25).

Das Aufkommen der Chemotherapeutika ab den 1960er Jahren ergänzten die Behandlungssäulen der HNSCC-Therapie um einen weiteren Pfeiler. Das initial verwendete Methotrexat wurde von 5-FU abgelöst. Ende der 1980er Jahre kamen Platin-basierte Chemotherapeutika auf, die auch heute noch u.a. bei rezidivierenden und/oder metastasierten (R/M) HNSCC nach dem EXTREME-Regime zum Einsatz kommen (91).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde das therapeutische Spektrum durch die Immuntherapeutika erweitert: 2006 wurde Cetuximab, ein EGFR-Inhibitor, durch die FDA zugelassen. Studien belegen ein besseres Überleben bei einer Kombination von Platin-5-FU mit Cetuximab verglichen mit der alleinigen Anwendung von Platin-5-FU (89). 2016 wurden die PD-1 Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab für die Therapie von r/m HNSCC zugelassen (16). Auch hier weisen Studien auf ein verbessertes Überleben bei alleiniger Anwendung oder in Kombination mit den gängigen Chemotherapeutika gegenüber einer alleinigen Anwendung von Chemotherapeutika hin (21). Allerdings sprechen nur 20 % der mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) behandelten Patienten (dauerhaft) auf die Therapie an (103). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Frauen schlechter auf die alleinige Therapie mit ICIs ansprechen als Männer (29, 107).

2.1.2 Prognose

Die wichtigsten präoperativen Marker sind der Immunstatus und das Alter. Metaanalyse zeigen, dass ein gehobenes Alter und Immunsuppression als prognostisch ungünstig betrachtet werden können.

Als bedeutender postoperativer Marker können neben dem TNM-Stadium auch positive Resektionsränder (R1 und R2) angesehen werden (67, 69) (Tabelle 2). Insbesondere eine zunehmende Anzahl an positiven Lymphknoten (N) gilt als ein negativer prognostischer Marker. Auch eine zunehmende Tumorgroße (T), in die auch die Invasionstiefe eines Primarius mit einfließt, sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) führen zu einem schlechteren 5-Jahres-Überleben (9). Eine perineurale Infiltration und ein extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen werden ebenfalls als prognostisch relevante negative Faktoren gewertet (42, 49, 67).

Allerdings reichen diese histopathologischen Faktoren zur genaueren interindividuellen Beurteilung des Therapieerfolgs und der Prognose nicht aus. Es werden Biomarker benötigt, um individuelle Therapiestrategien zu planen und Prognosen besser abschätzen zu können. Mit Ki67, einem Proliferationsmarker, und p16, das den Zellzyklus beeinflusst, werden bereits zwei Marker regelmäßig in der Diagnostik verwendet. Dabei ist eine hohe Ki67-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert (91). Der HPV-Status bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen ist ein weiterer Biomarker, dessen positive Expression mit einem besseren Überleben assoziiert ist. Ein HPV-positiver Status kann folglich als positiver prognostischer Marker bei Oropharynxkarzinomen gewertet werden (64). Auch eine hohe Expression des E-Cadherin-Gens ist als positiver prognostischer Marker für das Gesamt- und progressionsfreie Überleben zu werten (86).

Neben den Markern, die Aussagen über die Prognose zulassen, gibt es Marker, deren Vorhandensein die Therapiestrategie beeinflussen kann: Bei der Expression von Immuncheckpoints wie PD-L1- oder HLA-E auf r/m Plattenepithelkarzinomen kann der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) wie Pembrolizumab oder Monalizumab diskutiert werden (16). Obwohl der Einsatz von ICIs vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Überlebensvorteile liefert, profitiert nur ein Bruchteil der behandelten Patienten von ihrer Anwendung: Nur etwa 20 % der behandelten Patienten sprechen initial auf die Therapie an. Zudem entwickeln Patienten auch im Therapieverlauf Spätresistenzen. Bisher gibt es keine Biomarker, die das Ansprechen oder die Resistenzbildung zuverlässig vorhersagen können (54).

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in der modernen Medizin zunehmend Berücksichtigung findet, ist die individuelle und Geschlechter-angepasste Medizin. Viele Studien legen nahe, dass das Immunsystem von Männern und Frauen unterschiedlich auf extra- und intrakorporale Reize reagiert (58). Allerdings

fehlt es auch hier an Biomarkern, die eine Aussage über geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ansprache auf ein angewandtes Therapiekonzept zulassen.

Tabelle 2: Mögliche Biomarker zur Beurteilung der Prognose bei HNSCC-Patienten (46, 99)

<i>Klassifikation</i>	<i>Biomarker</i>	<i>Funktion</i>
<i>Zellzyklus</i>	P53	Tumorsuppressor, Kontrolliert Zellzyklus, Einleitung Apoptose
	Rb	Tumorsuppression, Kontrolliert Übergang G1- zu S-Phase
	P16 (36)	Verhindert Übergang in S-Phase
<i>Wachstum</i>	Ki67	Zellkernprotein, Lagert sich während der G1-, S-, G2 und M-Phase an Chromosomen
<i>Signaltransduktion</i>	VEGF	Angiogenese, Lymphangiogenese
<i>Zelladhäsion</i>	E-Cadherin	Transmembranes Glykoprotein, Zell-Zell-Adhäsion
<i>Immunflucht</i>	PD-1/PD-L1	Transmembranprotein, Hemmung der T-Zellen
	HLA-E	Oberflächenprotein, Interaktion mit CD94/NKG2A-Rezeptor der NK-Zellen
<i>Viren</i>	HPV 16	Verstärkt Expression von Onkogenen und inaktiviert Tumorsuppressorgene
<i>Invasion/Metastasierung</i>	Cortactin	Intrazelluläres Protein, vermittelt/stabilisiert Bildung von Lamellipodia und Zellmigration

Anmerkung: Die Liste umfasst einige Beispiele für mögliche Biomarker unterschiedlicher Klassifikationen. Es besteht kein Anspruch auf Vollständigkeit.

2.2 Humane Leukozytenantigene

Die humanen Leukozytenantigene (HLA) sind membranständige Glykoproteine, denen eine bedeutende Rolle bei der Erkennung körpereigener und –fremder Strukturen durch das Immunsystem zukommt. Dabei binden die HLA-Moleküle intrazellulär gespaltene Peptide und präsentieren sie an der Zelloberfläche verschiedener Immunzellen. Diese können bei körperfremden oder pathologisch veränderten Peptiden eine Immunreaktion auslösen (24).

Die HLA-Moleküle lassen sich anhand ihrer Struktur, Funktion und Expression in HLA-Moleküle der Klasse I und Moleküle der Klasse II unterscheiden. HLA-Klasse-II-Moleküle bestehen aus einer leichten β - und einer schweren α -Kette. Beide Ketten sind, im Gegensatz zu HLA-Klasse-I-Molekülen, in der Zellmembran verankert. HLA-II-Moleküle werden auf antigenpräsentierenden Zellen (AP-Zellen) wie Makrophagen und dendritischen Zellen sowie auf B-Zellen exprimiert. Sie werden im glatten endoplasmatischen Retikulum mit zuvor lysosomal gespalteten Peptiden, die von den AP-Zellen phagozytiert wurden, beladen und an der Zelloberfläche zusammen mit einem CD-4 Rezeptor präsentiert. Dort interagieren sie mit den $CD4^+$ T-Lymphozyten, die durch Aktivierung der B-Lymphozyten eine humorale Immunantwort auslösen können.

HLA-Klasse-I-Moleküle lassen sich unterscheiden in klassische (HLA-A, -B und -C) und nicht-klassische (HLA-E, -F, -G und -H) HLA-I- Moleküle. Während die klassischen HLA-Moleküle einen hohen Polymorphismus aufweisen, sind die nicht-klassischen HLA-Moleküle eher monomorph aufgebaut. HLA-I-Moleküle sind ubiquitär auf zellkernhaltigen Zellen exprimiert. Sie bestehen aus einer schweren α -Kette, über die sie in der Zellmembran verankert sind. Die α - Kette besteht aus 3 Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$), an die $\beta 2$ -Mikroglobulin als 4. Domäne angelagert ist (Abbildung 1). Im Gegensatz zu den HLA-II-Molekülen, die auch körperfremde Peptide binden, präsentieren HLA-I-Moleküle zelleigene, 8-10 Aminosäuren lange Peptide auf der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne, die zuvor in Proteasomen prozessiert und im ER an HLA-I-Moleküle gebunden wurden. An der Zelloberfläche werden diese HLA-I-gebundenen Peptide $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentiert, die eine Immunantwort auslösen können.

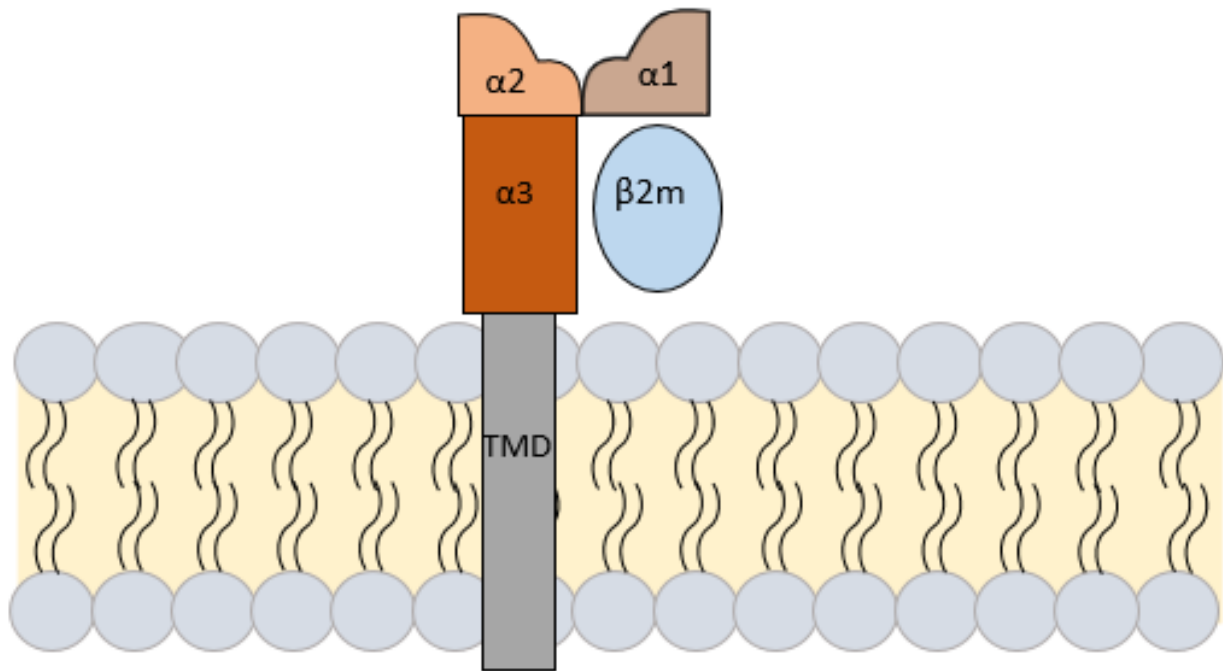


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Moleküls. Nicht klassische HLA-I-Moleküle besitzen eine Transmembrandomäne, über die sie in der Zellmembran verankert sind. Die α -Kette besteht aus 3 Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$. An die α -Domäne ist $\beta 2$ -Mikroglobulin angelagert. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen bilden die Peptid-Bindestelle.

2.3 HLA-E

Das humane Leukozytenantigen E (HLA-E) gehört zu den nicht-klassischen HLA-Molekülen. Es wird physiologischerweise in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert (17). 10 Allelen auf dem langen Arm des Chromosom 6 kodieren für das HLA-E-Molekül (33). Der Aufbau ist identisch zu dem der anderen HLA-I-Molekülen. Verglichen mit den klassischen HLA-Molekülen weist HLA-E als nicht-klassisches HLA-I-Molekül einen geringeren Polymorphismus auf (79). Während die klassischen HLA-I-Moleküle zelleigene Peptide präsentieren, übernimmt HLA-E die Präsentation prozessierter Bestandteile der klassischen HLA-I-Moleküle (41). HLA-E interagiert zudem nicht nur über den T-Zell-Rezeptor mit den CD8⁺ T-Zellen, sondern auch über die CD94/NKG2-Rezeptoren mit den NK-Zellen. Somit bildet HLA-E eine Verbindung zwischen der erworbenen und angeborenen Immunantwort (84) (Abbildung 2).

2.3.1 Funktion von HLA-E in Tumoren

Die Tumorentstehung und -progression ist durch eine veränderte Wirt-Tumor-Interaktion ausgezeichnet. Während in einem funktionierenden System pathologisch veränderte Zellen durch Immunzellen beseitigt werden, kann dieser Vorgang von Tumorzellen vermieden werden. Durch verschiedene „Immune escape“ Mechanismen entziehen sich die Tumorzellen einer Elimination durch das Immunsystem.

Ein bekannter Mechanismus von Tumorzellen, um der Immunantwort zu entkommen, ist eine veränderte Expression immunmodulativer Moleküle auf der Zelloberfläche (92). Dazu gehören Vertreter des HLA-I-Systems, die exprimierte Peptide die Immunantwort beeinflussen können. Um eine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zu vermeiden, wird die Expression der klassischen HLA-I-Moleküle auf der Zelloberfläche herunterreguliert. Eine veränderte HLA-I-Expression führt jedoch zu einer Aktivierung der NK-Zellen gegen die Tumorzellen (65). Allerdings werden nicht alle HLA-I-Moleküle vermindert exprimiert: Das nicht-klassische HLA-I, E wird in vielen Tumorentitäten, u.a. im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, kolorektalen Karzinom und auf Kopf- Halstumoren, hochreguliert (98).

Durch die Überexpression von HLA-E wird die Aktivität der Immunzellen zugunsten der Tumorzellen gehemmt. Die Tumorzelle entziehen sich auf diese Weise der Zerstörung durch das Immunsystem.

2.3.2 HLA-E – T-Zell-Interaktion

Die Interaktion zwischen den klassischen HLA-I Molekülen auf der Zelloberfläche und dem TCR auf den CD8⁺T-Zellen ist bekannt und gut untersucht. Allerdings kann auch HLA-E als nicht-klassisches MHC-Ib-Molekül mit dem TCR interagieren.

Bevor eine naive T-Zelle, d.h. eine T-Zelle, die noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatte, ihre Zielzelle zerstören kann, muss sie aktiviert werden. Die naive T-zelle zirkuliert so lange durch das Blut und die lymphatischen Organe, bis sie von einer AP-Zelle ihr spezifisches Antigen präsentiert bekommt (4). Es kommt zur klonalen Expansion und Differenzierung, bei der T-Effektor und – Gedächtniszellen mit identischer Spezifität entstehen. Die CD8⁺ T-Effektorzellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Nach der klonalen Expansion gelangen die T-Zellen wieder in den Blutkreislauf (78). CD8⁺-T-Effektorzellen sind in der Lage, alle Effektormoleküle (z.B. Perforin) zu synthetisieren, die sie für die Abtötung ihrer Zielzelle benötigen. Zudem ist für ihre Aktivierung keine Co-Stimulation erforderlich (78). Bindet die zytotoxische T-Zelle nun über den T-Zell-Rezeptor (TCR) ihr spezifisches, von einem HLA-I-Molekül präsentiertes Antigen, wird sie aktiviert und leitet die Apoptose, den programmierten Zelltod, der Zielzelle ein. Es sind ein extrinsischer und ein intrinsischer Apoptoseweg bekannt. Der extrinsische Apoptoseweg bezeichnet die Einleitung der Apoptose durch extrazellulär bindende Liganden. Der intrinsische Weg ist eine Reaktion auf schädigende Reize wie Chemotherapeutika. Es kommt zu einer Freisetzung von Perforin, Granzymen und Granulysin aus den Granula der T-Zelle. Perforin bildet Poren in der Membran der Tumorzelle. Dies führt zu einer ersten Schädigung der Zelle und ermöglicht das Eindringen der Granzyme in das Cytoplasma der Tumorzelle. Granzym A löst die Apoptose durch Schädigung der Mitochondrien aus. Granzym B aktiviert die Caspase 3 und somit die Caspasekaskade, an deren Ende die DNA fragmentiert wird. Über Granzym B kann auch der intrinsische Apoptoseweg aktiviert werden. Die Zellreste werden anschließend von Phagozyten aufgenommen und vollständig abgebaut (4, 78).

2.3.3 HLA-E – NK-Zell-Interaktion

Viele Funktionen der NK-Zellen in der anti-tumor Antwort ähneln denen der CD8⁺-T-Zellen. Wie auch die T-Zellen können NK-Zellen über die Aktivierung von Todesrezeptoren auf der Zielzelle die Apoptose auslösen. Dabei kommt es zur Freisetzung von Perforin und Granzym B aus den Granula der NK-Zellen, durch die die Apoptose der Zielzelle eingeleitet wird. Zudem sezernieren sie entzündungsfördernde Zytokine (u.a. IFN γ und TNF α), die Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen aktivieren und somit die Immunantwort verstärken (1).

NK-Zellen haben keine klonal geformten Rezeptoren, die ein spezifisches Antigen erkennen. Im Gegensatz zu T-Zellen wird die Aktivität von NK-Zellen von keimbahnkodierten Oberflächenrezeptoren gesteuert. Aus der Summe der Stimulation oder der Hemmung dieser Rezeptoren resultiert die Aktivität der NK-Zelle (83). Zu diesen Oberflächenmolekülen gehören neben dem hemmenden Killerzell-Immunglobulin ähnlichen Rezeptors (KIR) auch die CD94/NKG2-Rezeptoren, die durch die Interaktion von HLA-E auf der Zielzelle aktiviert werden. Der CD94/NKG2-Rezeptorkomplex lässt sich unterscheiden in hemmende (NKG2A, -B) und aktivierende (NKG2C und -D) Rezeptorkomplexe (34). Aus der hohen Bindungsaffinität zwischen HLA-E und dem hemmenden Rezeptorkomplex CD94/NKG2A (20) resultiert eine Hemmung der NK-Zell-Aktivität. Die Apoptose der Zielzelle wird verhindert.

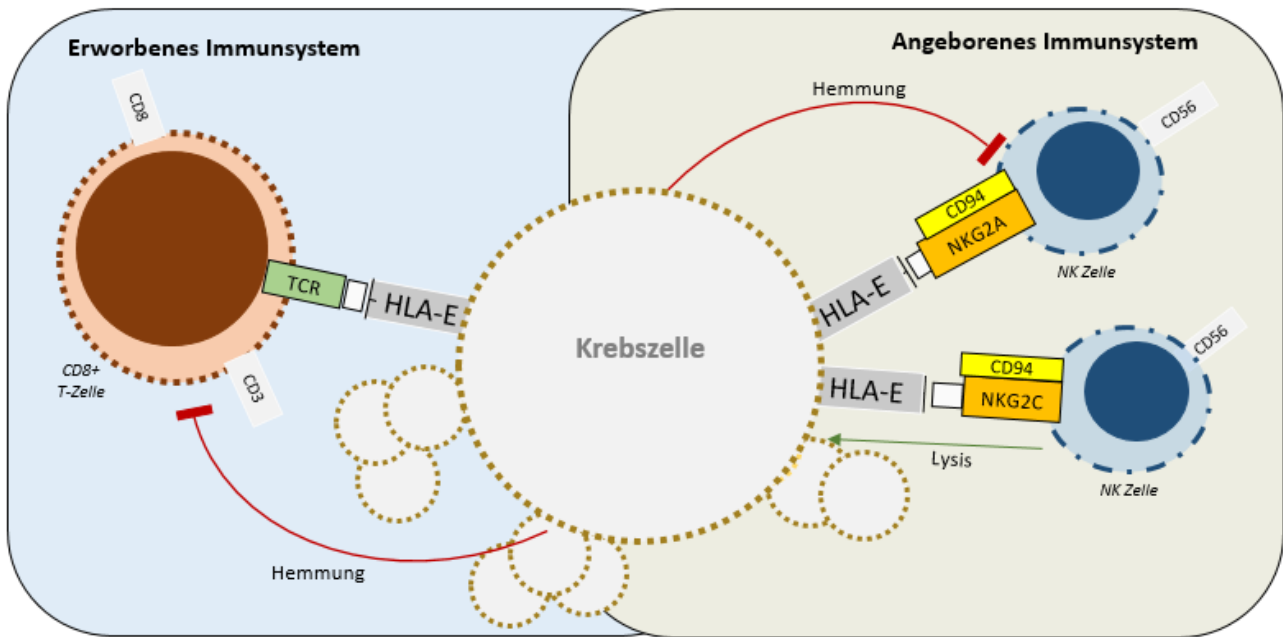


Abbildung 2: Interaktion von HLA-E mit NK- und T-Zellen. Schematische Übersicht über die Interaktion zwischen HLA-E auf der Tumorzelloberfläche und den CD94/NKG2-Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen. Die Bindung von HLA-E mit dem CD94/NKG2C-Rezeptor führt zu einer Aktivierung der NK-Zelle und somit zur Einleitung der Lyse der Tumorzelle. Allerdings bindet HLA-E mit einer wesentlich höheren Affinität an den CD94/NKG2A-Rezeptor, der eine Aktivierung der NK-Zelle inhibiert. Auf diese Weise entzieht sich die Tumorzelle der durch die NK-eingeleitete Lyse. HLA-E interagiert auch mit einer Subpopulation der T-Zellen, den CD8⁺ T-Zellen. Über den T-Zell-Rezeptor können sie von HLA-E präsentierte Peptide erkennen, was in einer Aktivierung und Expansion der CD8⁺ T-Zellen resultiert.

2.4 Lösliche HLA-Moleküle

HLA-Moleküle kommen nicht nur membranständig vor. Sie lassen sich auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten, z.B. dem Blutplasma und –serum, nachweisen und werden als gelöstestes HLA („soluble HLA“) bezeichnet (28). Soluble HLA (sHLA) kann durch verschiedene Vorgänge gebildet werden. Die daraus resultierenden Moleküle unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht: Die schwerste Molekülform (44 Kilodalton (kD)) stellt ein HLA-Molekül in voller Ausstattung dar, wie es auch auf der Zelloberfläche vorkommt. Es wird angenommen, dass sie durch Exozytose ins Blut gelangen. Die intermediäre Form weist ein Molekulargewicht von 40-41 kD auf. Sie entsteht durch alternatives Splicing. Ihr fehlt der auf dem 5. Exon kodierte transmembrane hydrophile Anker. Die leichteste Form mit 37-39 kD kommt durch proteolytische Spaltvorgänge an der Zelloberfläche zustande. Dabei wird die membrangebundene schwere Kette des HLA-Moleküls durch Metalloproteasen gespalten (11, 56). In Melanomzelllinien konnte anhand des Molekulargewichts gezeigt werden, dass das gelöste HLA-E vor allem durch proteolytische Spaltvorgänge entsteht (30).

Die Konzentration von sHLA-I Molekülen ist bei unterschiedlichen Erkrankungen, auch bei Krebs, verändert (5, 32, 93). Über den prognostischen Wert einer erhöhten sHLA-Konzentration im Blut krebserkrankter Probanden lässt die aktuelle Studienlage keine eindeutige Aussage zu. Allerdings bringen mehrere Studien eine erhöhte sHLA-Konzentration mit einer höheren Tumoraggressivität und einem schlechteren Outcome in Zusammenhang (2, 5, 56, 57, 85).

2.4.1 Funktion von sHLA und sHLA-E

Die Funktion von gelösten HLA-Molekülen ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings können gelöste HLA-Moleküle dieselben Rezeptoren binden wie ihre membranständigen Äquivalente. Sie scheinen daher eine immunmodulierende Wirkung zu haben (104). In vitro führen sHLA-I-Moleküle zu einer Hemmung der CD8⁺ T-Zell- und NK-Zell-Funktion. Zudem scheint sHLA-I in diesen Zelltypen die Apoptose auslösen zu können (11, 23). Wie auch die anderen sHLA-I-Moleküle zeigt sHLA-E eine immunmodulatorische Funktion: sHLA-E begünstigt die „Immune evasion“ pathologisch veränderter oder viral infizierter Zellen (96), wodurch ein tumorbegünstigendes Milieu entsteht. Allerdings kann

sHLA-E, im Gegensatz zu seiner membrangebundenen Variante, auch tumorferne Immunzellfunktionen hemmen und somit einen schützenden Effekt vor der Lyse durch NK-Zellen bewirken (28).

2.4.2 Regulation von sHLA-E

Soluble HLA-E kann von Tumorzellen, vornehmlich durch proteolytische Spaltvorgänge auf der Zelloberfläche, freigesetzt werden. Diverse Studien berichten über eine erhöhte sHLA-E Konzentration im Blut von Tumorpatienten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe (7, 73, 75). Allerdings haben auch andere Zelltypen Einfluss auf die sHLA-E Konzentration im Blut: sHLA-E wird auch von aktivierten endothelialen Zellen (28) und Makrophagen (22) freigesetzt.

Wie die Funktion ist auch die Regulation von sHLA-E nicht vollständig geklärt. Obwohl ein positiver Zusammenhang zwischen der membranständigen HLA-Expression und der Serumkonzentration des korrelierenden sHLA-Moleküls erwartet werden könnte, ist dies nicht zwingend der Fall (56).

Ein wichtiger Regulator der sHLA-E Freisetzung und der Expression ist IFN γ . IFN γ führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression und proteolytische Freisetzung von HLA-E (7, 56). Neben IFN γ soll auch TNF α die Freisetzung von sHLA-E erhöhen. Neben diesen Zytokinen werden auch die an der proteolytischen Spaltung von membranständigem HLA beteiligten MMPs als mögliche Regulatoren der sHLA- Konzentration in Betracht gezogen (90). Die Expression und Aktivität von MMPs wiederum wird von vielen weiteren Faktoren, wie etwa den Geschlechtshormonen, beeinflusst (15, 80, 87).

2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort

2.5.1 Ablauf Immunantwort

Das übergeordnete Ziel des Immunsystems ist die Erkennung von Eigen und Fremd und die Elimination von Pathologien. Es lässt sich unterteilen in eine angeborenes und eine erworbenes Immunsystem, die allerdings eng zusammenarbeiten. Beide Immunantworten lassen sich weiter unterteilen in einen zellulären und humoralen Abwehrmechanismus.

Das angeborene Immunsystem ist von Geburt an vorhanden und benötigt keine Prägung auf spezifische Antigene, sondern wird direkt bei Kontakt mit einem Pathogen aktiviert. Dabei reagiert es auf alle Pathogene gleich, weshalb es auch als „unspezifisches Immunsystem“ bezeichnet wird (100). Zum zellulären Bestandteil des angeborenen Immunsystems werden die NK-Zellen gezählt. Sie können bei fehlender oder veränderter MHC-I-Expression auf einer Zelle die Apoptose der betroffenen Zelle einleiten (13). Zu den humoralen Mechanismen der angeborenen Immunantwort gehört das Komplementsystem, das zum einen Pathogene opsonieren und somit ihre Phagozytose erleichtern und zum anderen die Lyse von Pathogenen einleiten kann (95). Auch proinflammatorische Zytokine wie $\text{IFN } \alpha$, $\text{IFN } \beta$, $\text{IFN } \gamma$ und $\text{TNF } \alpha$ und Interleukine gehören zum humoralen Teil des angeborenen Immunsystems.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort müssen für das Auslösen der erworbenen Immunantwort antigenspezifische Zellen aktiviert werden. Die Antigene werden den Immunzellen über spezifische Rezeptoren präsentiert. Die erworbene Immunantwort läuft daher zwar langsamer als die angeborene Immunantwort ab, ist allerdings effektiver. Bei erneuter Präsentation eines bekannten Antigens läuft die Immunantwort schneller ab (100). Zu den zellulären Bestandteilen des erworbenen Immunsystems zählen die T- und die B-Zellen. Die T-Zellen werden unterteilt in CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen. Die CD8^+ -T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen, werden durch Antigene, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, aktiviert und bewirken eine direkte Lyse der Zelle, indem sie die Apoptose einleiten. Die CD4^+ -T-Zellen, auch als T-Helferzellen bezeichnet, aktivieren weitere Immunzellen und Makrophagen, um die Immunantwort zu verstärken (100). B-Zellen werden von den T-Helferzellen aktiviert und produzieren nach der Aktivierung Antikörper, die speziell gegen den Erreger gerichtet sind, der die Immunreaktion ausgelöst hat (100). Die von den B-Zellen produzierten Antikörper werden auch als humoraler Teil des erworbenen Immunsystems verstanden. Antikörper können zum einen Pathogene bekämpfen, indem sie diese binden. Zum anderen sind sie in der Lage weitere Immunzellen zu aktivieren und somit die Immunantwort zu verstärken (100).

2.5.2 Geschlechterspezifische Unterschiede in der angeborenen und erworbenen Immunantwort

Die immunologische Reaktion von Frauen und Männern weist Unterschiede bei der Erkennung von körpereigenen und –fremden Antigenen auf. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass es geschlechterspezifische Unterschiede sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort gibt (58, 62). Nicht nur bei Menschen, sondern auch bei anderen Vertebraten, Vögeln und Insekten scheint das weibliche Immunsystem eine stärkere Aktivität aufweist als das männliche Immunsystem (59). Bei genauerer Betrachtung der zellulären Ebene lassen sich Unterschiede sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort zwischen Männern und Frauen finden.

Sowohl die Anzahl als auch die Aktivierung einiger Komponenten des angeborene Immunsystem unterscheiden sich zwischen Männern und Frauen. Männer weisen eine höhere Anzahl an NK-Zellen auf. Allerdings ist, unter anderem, die phagozytotische Kapazität sowohl der Makrophagen als auch der neutrophilen Granulozyten bei Frauen höher. Auch die Aktivierung der Makrophagen und die IL-10 Produktion durch die Makrophagen ist bei Frauen stärker nachweisbar als bei Männern. Daneben sind die Antigen-präsentierenden Zellen der Frauen effektiver als die der Männer (58).

Auch das erworbenes Immunsystem weist Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf: Die CD4+-T-Zell-Anzahl ist bei Frauen höher als bei Männern, dafür weisen Männer eine höhere CD8+-T-Zell-Anzahl auf als Frauen. Daraus resultiert, dass das CD4+/CD8+-Verhältnis bei Frauen höher ist als bei Männern. Die T-Zell Proliferation sowie ihre zytotoxische Aktivität ist bei Frauen stärker ausgeprägt als bei Männern. Auch die B-Zell Anzahl sowie die Antikörperproduktion ist bei Frauen größer als bei Männern (58).

Ursächlich für diese Unterschiede sind unter anderem die Geschlechtschromosomen. Sowohl auf dem X-Chromosom als auch auf dem Y-Chromosom sind Gene vorhanden, die die Funktion und die Aktivität des Immunsystems beeinflussen (z.B. TLR7 auf dem X-Chromosom) (58). Auch den MikroRNAs, die auch von Geschlechtshormonen reguliert werden, wird eine Funktion bei Geschlechterunterschieden in der Immunantwort zugesprochen. Geschlechtshormone beeinflussen nicht nur die MikroRNA, sondern weitere Faktoren, die Einfluss auf die Aktivität der angeborenen und erworbenen Immunantwort haben (44, 50, 58). Beispielsweise erhöht Östrogen die CD8+-T-Zell Antwort, während sie von Progesteron vermindert wird. Androgene vermindern die Anzahl und die Aktivität der CD8+-T-Zellen (58).

Die Geschlechtsunterschiede in der Immunantwort sind allerdings dynamisch. Sie ändern sich im Laufe des Lebens in Abhängigkeit vom Alter und vom Reproduktionsstatus (58).

2.5.3 Unterschiede in der Wirksamkeit von ICBs zwischen Männern und Frauen

Immuncheckpoint Inhibitoren (ICI) stellen seit einigen Jahren eine neue Option im Kampf gegen Krebs dar. Neben dem seit wenigen Jahren für metastasierende und/oder rezidivierende Plattenepithelkarzinome zugelassenen PD-L1 Hemmer Pembrolizumab (77), soll der anti-NKG2A-Antikörper Monalizumab, der sich aktuell noch in klinischen Studien befindet, eine weitere Behandlungsoption bieten. Allerdings spricht nur ein kleiner Teil der mit ICBs behandelten Patienten (dauerhaft) auf die Therapie an (101). Zudem geben geschlechterspezifische Unterschiede, sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort, Hinweise darauf, dass auch die Wirkung von Immuncheckpoint Inhibitoren (ICI) bei Männern und Frauen unterschiedlich sein könnte.

Einige Studien deuten darauf hin, dass die Vorteile der ICIs hinsichtlich des Gesamtüberlebens geschlechtsabhängig sind (19, 26). So scheinen Männer mehr von der alleinigen Therapie mit ICIs zu profitieren als Frauen. Frauen wiederum scheinen besser auf eine Kombination aus ICI und Chemotherapeutika anzusprechen als Männer (107). In der Keynote-Studie konnte gezeigt werden, dass Männer mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) ein besseres OS und PFS unter der Therapie mit dem PD-L1 Hemmer Pembrolizumab verglichen mit Chemotherapeutikum Doxetaxel aufweisen als Frauen (47).

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die zwar auf ein verbessertes Überleben bei ICI Therapie hinweisen, aber keine geschlechterspezifischen Vorteile einer solchen Therapie feststellen konnten (106). Als ursächlich für die Diskrepanz dieser Ergebnisse werden die untersuchten Patientengruppen angesehen, wobei der Anteil der männlichen Patienten deutlich über dem Anteil der weiblichen Patienten lag (106).

2.6 Zielsetzung

Der prognostische Wert von HLA-E soll in einer OSCC Kohorte anhand einer immunhistologischen Färbung eines Gewebe Mikroarrays (TMA) retrospektiv untersucht und mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern korreliert werden.

In einer weiteren Kohorte soll die sHLA-E Konzentration im Blutserum von OSCC-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe mittels ELISA untersucht und anschließend mit den klinisch pathologischen Parametern, insbesondere dem Geschlecht, korreliert werden.

Ziel ist eine geschlechtsdifferenzierte Untersuchung der HLA-E Oberflächenexpression und seine Bedeutung als prognostischer und therapieorientierter Marker. Da es für OSCC keinen prognostischen geschlechtsspezifischen Marker gibt, der auch im Blut nachweisbar ist, soll die sHLA-E Konzentration im Serum untersucht und vor diesem Kontext diskutiert werden. Folgende Untersuchungen sollen die Grundlage für die Diskussion liefern:

1. Immunhistochemischer Nachweis von HLA-E auf dem Gewebe Mikroarray und Untersuchung eines Zusammenhangs mit den klinisch-pathologischen Parametern.
2. Retrospektive statistische Analyse des Einflusses von HLA-E auf das Überleben von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom.
3. Untersuchung der sHLA-E Konzentration im Serum einer Kohorte aus OSCC-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe durch einen ELISA. Anschließend soll eine Korrelation zwischen der sHLA-E Konzentration und den klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere dem Geschlecht, erfolgen.

3 Patienten und Methodik

3.1 Ethikanträge

3.1.1 Ethikantrag Gewebe-Mikroarray

Das Studiendesign, die Methodik und die Verwendung des zur Verfügung gestellten Probematerials wurden durch das Ethikvotum der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Ethikantragsnummer 193/2003) genehmigt. Zur Herstellung des Gewebe-Mikroarrays (Tissue Microarray (TMA)) wurde Gewebematerial aus der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Heidelberg verwendet. Alle Teilnehmer wurden über das Vorgehen aufgeklärt und haben ihre Teilnahme schriftlich bestätigt.

3.1.2 Ethikantrag Enzyme linked Immunosorbent Assay

Die Studie und die Verwendung des Probandenmaterials wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes unter der Antragsnummer 37/20 genehmigt. Alle Studienteilnehmer wurden über das Vorgehen aufgeklärt und bestätigten ihre Teilnahme schriftlich. Die Blutproben wurden von der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Aufbau und Analyse eines Gewebe-Mikroarrays

Zunächst wurden die klinischen Daten der Probanden recherchiert, um sie in die statistische Analyse aufnehmen zu können. Von besonderem Interesse hierbei waren die TNM-Klassifikation, das UICC-Stadium, das progressionsfreie Überleben, ein eventuelles Sterbedatum, das Geschlecht und das Alter. Patienten, zu denen keine klinischen Daten vorhanden waren, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Anschließend wurden die TMAs mit einem Antikörper gegen HLA-E (Abcam, [MEM-E/02] (ab2216)) immunhistochemisch gefärbt. Nach Auswertung der Färbung konnten durch statistische Analysemethoden Zusammenhänge zwischen den klinischen Parameter und den Ergebnissen der Färbung untersucht werden.

3.2.2 Vorgehen und Analyse eines Enzyme linked Immunosorbent Assay

Für das ELISA-Kollektiv wurden die klinischen Daten der Patienten und der gesunden Kontrollgruppe recherchiert. In der Patientengruppe wurden die klinischen Angaben zum Geschlecht, Alter, zum UICC-Stadium und zur TNM-Klassifikation herausgesucht. In der gesunden Kontrollgruppe wurden das Alter, das Geschlecht und die Vorerkrankungen dokumentiert. Für die Durchführung des ELISAs wurde das Blutserum der Probanden verwendet. Dabei wurden die Seren entsprechend der Herstelleranweisungen in die Kavitäten einer mit einem Antikörper gegen HLA-E beschichteten 96-Well-Platte (HLA-E ELISA Kit (Catalog No. ABIN6956585), antibodies-online GmbH, Limerick, PA, United States) pipettiert. Die unterschiedlichen Farbumschläge in den einzelnen Kavitäten konnten nach Beendigung des Versuchs kolorimetrisch quantifiziert werden. Nach Ermittlung der sHLA-E Konzentration mittels linearer Interpolation wurden die Ergebnisse mit den klinischen Daten korreliert.

3.3 Gewebe-Mikroarray

3.3.1 Methode

Bei einem Gewebe-Mikroarray werden gewebehaltige Stenzen, sogenannte Cores, aus formaldehydfixierten und paraffinierten Spenderblock in einen leeren Paraffinblock, den Akzeptorblock, transferiert. Bei der Anordnung der Cores wird auf ein rotationsinvariantes Layout geachtet, damit eine eindeutige Zuordnung der Cores zum Spenderblock und somit zum Patienten möglich ist. Mit einer immunhistochemische Färbung der Schnitte des Akzeptorblockes mit spezifischen Antikörpern können die entsprechenden Oberflächenproteine auf den einzelnen Cores dargestellt werden.

Ein Vorteil dieser Technik ist seine platz- und gewebesparende Eigenschaft. Abhängig vom gewählten Durchmesser der Cores und der Größe des Akzeptorblockes lassen sich mehrere Hundert Cores auf einem TMA-Block platzieren. Somit ist die Schädigung des Spenderblocks geringfügig. In einem TMA-Block und den zugehörigen Schnitten kann Material von vielen Patienten gesammelt und zeitgleich untersucht werden. Eine Färbung der Schnitte ist kostengünstig und zeitsparend verglichen mit dem Aufwand, den eine Färbung der Schnitte der Donorblöcke bedeutet. Durch das gleichzeitige händische Färben vieler Patientenproben auf wenigen Objektträgern wird zudem eine bessere Vergleichbarkeit der Färbungen erzielt, da die Rahmenbedingungen, wie etwa die Einwirkzeiten, für alle Patientenproben exakt gleich sind.

Durch den geringen Durchmesser der Cores kann allerdings nicht das gesamte zur Verfügung stehende Material eines Patienten dargestellt werden. Durch nicht-repräsentative Gewebeprobe oder fehlerhaft platzierte Cores kann es zu einem Informationsverlust kommen. Um dem entgegenzuwirken, werden meist mehrere Stenzen pro Patient auf einem TMA untersucht.

3.3.2 Auswahl von Patienten und Gewebe

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die zwischen 2010 bis 2016 aufgrund eines oralen Plattenepithelkarzinoms operiert wurden. Die Patienten erhielten eine leitliniengerechte primär chirurgische Therapie nach Entscheidung des interdisziplinären Tumorboards. Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien erhielten zusätzlich eine leitliniengerechte adjuvante Radiochemotherapie. Nach der operativen Entfernung des Tumors und der Lymphknotenausräumung im Halsbereich (Neck Dissection (ND)) wurde das Gewebe durch das Pathologische Institut der Universität Heidelberg gesichtet. Es erfolgte eine Fixierung der Proben in Formalin mit einer anschließenden Einbettung in Paraffin. Anschließend wurden von dem eingebetteten Gewebe Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für die abschließende pathologische Beurteilung angefärbt. Neben der Tumorentität war auch die Tumorgroße ein Aufnahmekriterium in die Studie: Bei intakter Basalmembran (Carcinoma in situ (Cis)) wurde der Proband aus der Studie ausgeschlossen. Nach abgeschlossener Diagnostik durch das pathologische Institut wurden die Blöcke der Studie zur Verfügung gestellt.

3.3.3 Herstellung eines Gewebe-Mikroarrays

Vor dem eigentlichen Stanzvorgang müssen in Frage kommende Patienten und sowie ihre klinischen Daten recherchiert werden. Neben den klinischen Daten sind die sog. H-Nummern und Fraktionen, unter denen Patientenblock und die zugehörigen HE-Schnitte archiviert sind, relevant. Unter Angabe der H-Nummer kann das archivierte Patientenmaterial im Pathologischen Institut angefordert werden. Anschließend werden die relevanten Areale mikroskopisch kontrolliert und auf den HE-Schnitten markiert. Der darauffolgende Stanzvorgang kann entweder händisch oder maschinell durchgeführt werden.

Für die Herstellung eines TMAs wird ein leerer Paraffinblock benötigt, in den die TMA-Stanzen eingesetzt werden. Es sollte auf eine gute Qualität des Leerblocks geachtet werden: Das Paraffin sollte die Retentionen der Einbettkassette vollständig ausfüllen. Zwischen der Einbettkassette und dem ausgehärteten Paraffin sollte sich kein Spalt bilden. Ein mangelhaft gefertigter Akzeptorblock birgt die

Gefahr, dass sich beim Schneiden des Blocks das Paraffin von der Kassette löst und der Block nicht mehr geschnitten werden kann.

Anschließend werden die Cores entsprechend eines zuvor festgelegten Layouts in den Empfängerblock gestanzt. Mit einer minimal kleineren Stanze als die, die für das Ausstanzen aus dem Donorblock verwendet wird, wird der Empfängerblock vorgestanzt. Anschließend wird aus dem vormarkierten Areal auf dem Donorblock mit einer zweiten, minimal größeren Stanze, das Gewebe entnommen und an die vorgestanzte Stelle auf dem Empfängerblock transferiert. Dieser Vorgang erfolgt für jeden Core bis das Layout vervollständigt ist und kann entweder von Hand oder maschinell erfolgen. Die unterschiedlichen Stanzengrößen werden gewählt, um den Gewebestücken Stabilität im Empfängerblock zu verleihen.

Für die Herstellung des in dieser Studie untersuchten TMAs wurde ein automatisches Stanzgerät der Firma AlphaMetrix verwendet. Es wurde ein Durchmesser der Cores von 0,6 mm gewählt. Zwischen den Cores wurde ein Abstand von 0,8 mm belassen. Zu den Blockrändern wurde ein Abstand von 2,5-3 mm eingehalten, um die Stabilität des Empfängerblocks zu gewährleisten. Mit den gewählten Maßen konnten bis zu 200 Stanzen auf dem Empfängerblock platziert werden. Zur besseren Orientierung wurde in der Vertikalebene nach jeder 6. Stanze ein Freiraum belassen. In der Horizontalebene wurden 8 Stanzen angeordnet (Abbildung 5). Von jeder Tumorprobe wurden mehrere Stanzen angelegt. Negativkontrollen wurden in unregelmäßigen Abständen in den TMA eingebracht. Abschließend wurden die fertigen TMA-Blöcke für eine Stunde bei 37°C inkubiert, damit sich das Paraffin des Empfängerblocks mit dem der Stanzen verbindet.

3.3.4 Schneiden der Gewebe-Mikroarrays

Vor dem Schneiden wurden die Blöcke auf einer Kühlplatte bei -20°C gekühlt und anschließend in einem Kryostat mit einem Mikrotom in Serienschnitten geschnitten. Von jedem TMA konnten ca. 150 verwertbare Schnitte mit einer Dicke von 4 µm hergestellt werden. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte auf ein 40°C warmes Wasserbad übertragen und danach auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Für eine schonende Trocknung wurden die Schnitte über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Methode

Die Methode dient zur Detektion von Antigenen in Gewebeschnitten. Dazu werden Antikörper gegen ein bestimmtes Epitop auf den entparaffinierten Gewebeschnitten gegeben. An diese Antikörper sind Marker gebunden, anhand deren das durch den Antikörper gebundene Epitop sichtbar gemacht wird. Man unterscheidet zwischen einer direkten und einer indirekten Methode zur Epitopdetektierung. Bei der direkten Methode bindet ein bereits markierter Antikörper an das Epitop und macht es sichtbar. Bei der indirekten Methode bindet zuerst ein unmarkierter Antikörper an das Epitop. An den unmarkierten Antikörper bindet dann ein zweiter, markierter Antikörper, der das Epitop detektiert.

Vorteil der direkten Methode ist, dass nur ein Antikörper benötigt wird. Dadurch läuft der Färbeprozess schneller, ist weniger fehleranfällig und kostengünstiger. Nachteil ist, dass die Färbintensität bei Gewebe mit wenigen Antigenen gering ausfallen kann.

Die indirekte Methode hat den Vorteil, dass sie die Farbintensität verstärken und somit auch für Gewebe mit geringerer Antigenexpression verwendet werden kann. Allerdings kann es durch die erhöhte Anzahl an Bindungen zu unspezifischen Bindungen kommen, die das Hintergrundsignal verstärken (105). Im Rahmen dieser Studie wurde sich für indirekte Methode entschieden.

3.4.2 Durchführung

Es wurden 5 unterschiedliche TMAs mit einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein HLA-E gefärbt. Hierfür wurde ein Antikörper der Firma abcam (Anti-HLA E Antikörper [MEM-E/02] (ab2216)) verwendet.

Zuerst wurden die TMAs auf den Färbeprozess vorbereitet. Hierfür wurden sie mit Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und hydriert (2x Xylol, 2x 100% Ethanol, 1x 96% Ethanol, 1x 75% Ethanol, 1x dest. H₂O, jeweils für 5 Minuten).

Zum Demaskieren der Antigene wurden die Objektträger in einer 10 mM Citratpufferlösung mit einem pH-Wert von 6,0 für 40 Minuten in einem Dampfgarer gekocht und anschließend für 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem die Schnitte 5 Minuten in PBS gewaschen worden waren, wobei sie die gesamte Zeit maschinell in der Lösung bewegt wurden, wurden sie durch Abklopfen auf eine saugfähige Unterlage getrocknet. Anschließend wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet.

Zur Deaktivierung der endogenen Peroxidase wurden 3-4 Tropfen BLOXALL Endogenous Enzyme Blocking Solution auf die Objektträger gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur (RT) wurden die Objektträger durch Abklopfen auf einen saugfähigen Untergrund getrocknet und in PBS für 5 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde zur Vermeidung von Kreuzreaktionen 2,5%iges Normal Horse Serum auf die Objektträger appliziert und für weitere 30 Minuten in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden durch das Abklopfen auf eine saugfähige Unterlage getrocknet. Nach diesem Schritt wurde nicht gewaschen.

Im Anschluss wurde der erste Anti-HLA-E-Antikörper mit einer Verdünnungslösung im Verhältnis 1:150 verdünnt und auf die Objektträger gegeben. Diese wurden über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Objektträger durch Abklopfen gereinigt und einmal 5 min mit PBS-T und danach zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Die Inkubation mit 2-3 Tropfen des zweiten Antikörpers (ImmPRESS Universal Antibody) erfolgte bei RT in der feuchten Kammer für 30 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper durch Abklopfen der Objektträger auf einen saugfähigen Untergrund gereinigt. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS für jeweils 5 Minuten.

Zur Darstellung des zweiten Antikörpers wurden die beiden ImmPACT DAB EqV Substrate in gleichen Anteilen gemischt und 6-7 Tropfen auf die Objektträger gegeben. Nach genau 60 Sekunden wurde die Lösung wieder durch Abklopfen entfernt. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten.

Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet, welches für 1-2 Sekunden auf die Objektträger gegeben und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gewaschen wurde.

Danach wurde die Färbung durch umgekehrtes Durchlaufen der Alkoholreihe fixiert (zuerst Ethanol 70%, 95%, 100%, danach zweimalig Xylol). Abschließend wurden die Objektträger mit Eukitt bestrichen und mit einem Deckglas versehen.

3.4.3 Auswertung

Nach abgeschlossener Färbung wurden die Schnitte mithilfe des Zeiss Scanners im Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes eingescannt. Über die entsprechende Software (Zen 3.8 lite) konnten die Bilder am Computer dargestellt und ausgewertet werden. Die HLA-E-Färbung wurde semiquantitativ durch mindestens 3 unabhängige und histologisch versierte Beurteiler/innen in 3 Kategorien von 1-4 (Tabelle 3) bewertet: Kategorie A bewertete die Anzahl der gefärbten Epithelzellen (Abbildung 3). In Kategorie B wurde die Intensität der Färbung bewertet (Abbildung 4). In Kategorie C wurde die Lokalisation der Färbung in der Zelle untersucht. In die spätere Auswertung des TMAs wurde die Kategorie C nicht miteinbezogen, da sich die Lokalisation der Färbung zwischen den verschiedenen Tumorgewebeprobe in der Regel konstant verhielt. Als Negativkontrolle dienten gesunde Mundschleimhautstanzen, von denen bis zu 5 pro TMA angeordnet wurden.

Nach der abgeschlossenen Beurteilung der Cores in den 3 Kategorien wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS der Median jedes Cores in der jeweiligen Kategorie berechnet. Die errechneten Scores repräsentieren das Expressionslevel von HLA-E auf der Zelloberfläche. Durch die Dokumentation der Scores und die Zuordnung zu einem Patienten konnte in SPSS eine Analyse des Expressionsniveaus und der klinischen Parameter der Patienten durchgeführt werden.

Tabelle 3: *Semiquantitatives Schema zur Bewertung der HLA-E Färbung.*

<i>Kategorie</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>A</i>	keine Färbung	< 33% gefärbt	34- 66% gefärbt	> 67% gefärbt
<i>B</i>	keine Färbung	schwach	mittel	stark
<i>C</i>	nukleär	nukleär und zytoplasmatisch	zytoplasmatisch	/

A: Anzahl der angefärbten Zellen, B: Intensität der angefärbten Zellen, C: Lokalisation der angefärbten Zellen

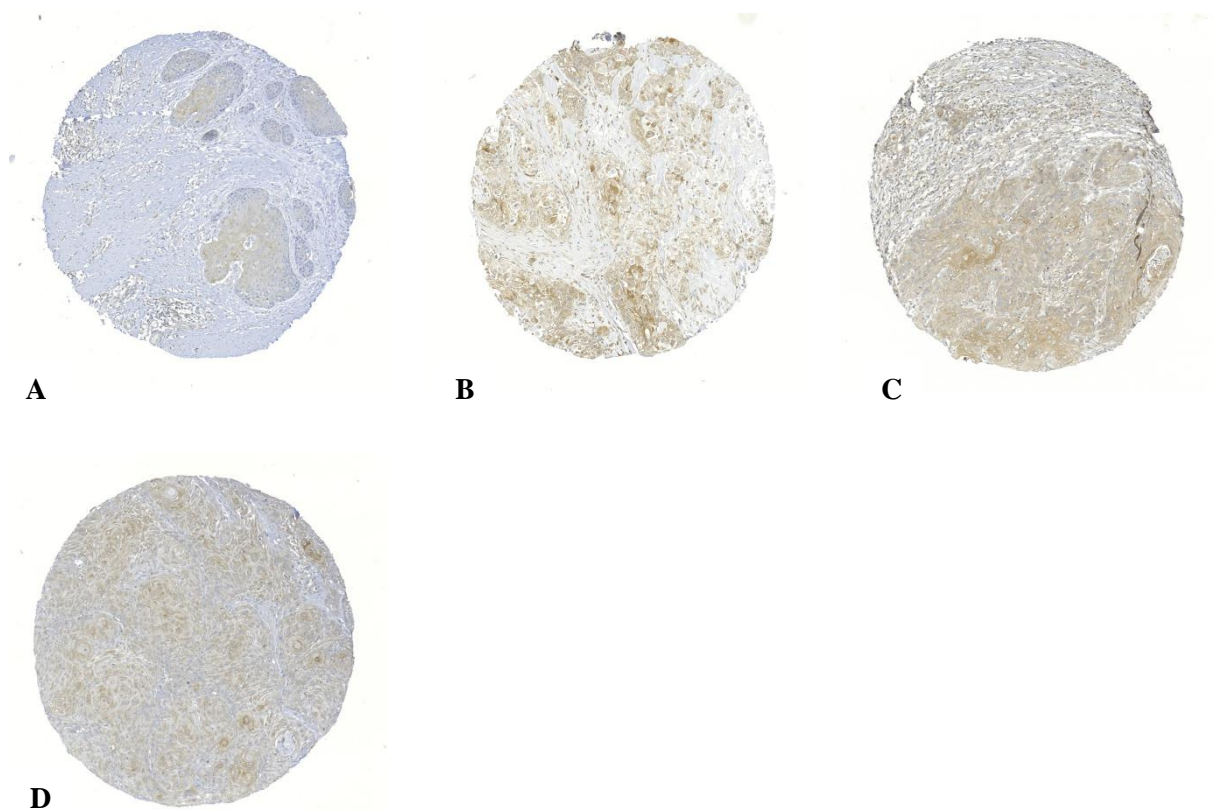
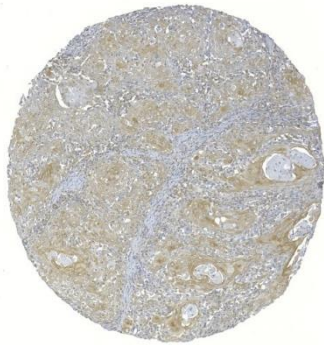


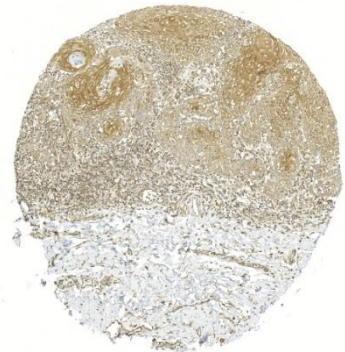
Abbildung 3: *Kategorie A: Anzahl der angefärbten Epithelzellen. A zeigt einen Core, dessen Anzahl an angefärbten Zellen mit einer 1 bewertet wurden. B zeigt einen Core, der in dieser Kategorie mit einer 2 bewertet wurde. C wurde mit einer 3 und D mit einer 4 bewertet.*



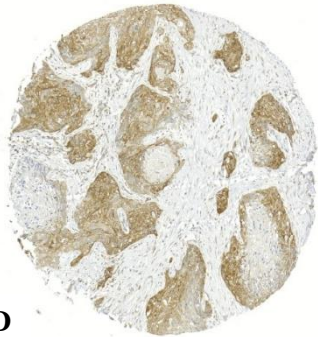
A



B



C



D

Abbildung 4: *Kategorie B: Intensität der Färbung. A wurde mit einer Intensität von 1 bewertet. B zeigt eine Anfärbeintensität von 2. C zeigt eine Farbintensität von 3. D wurde mit einer Intensität von 4 bewertet.*

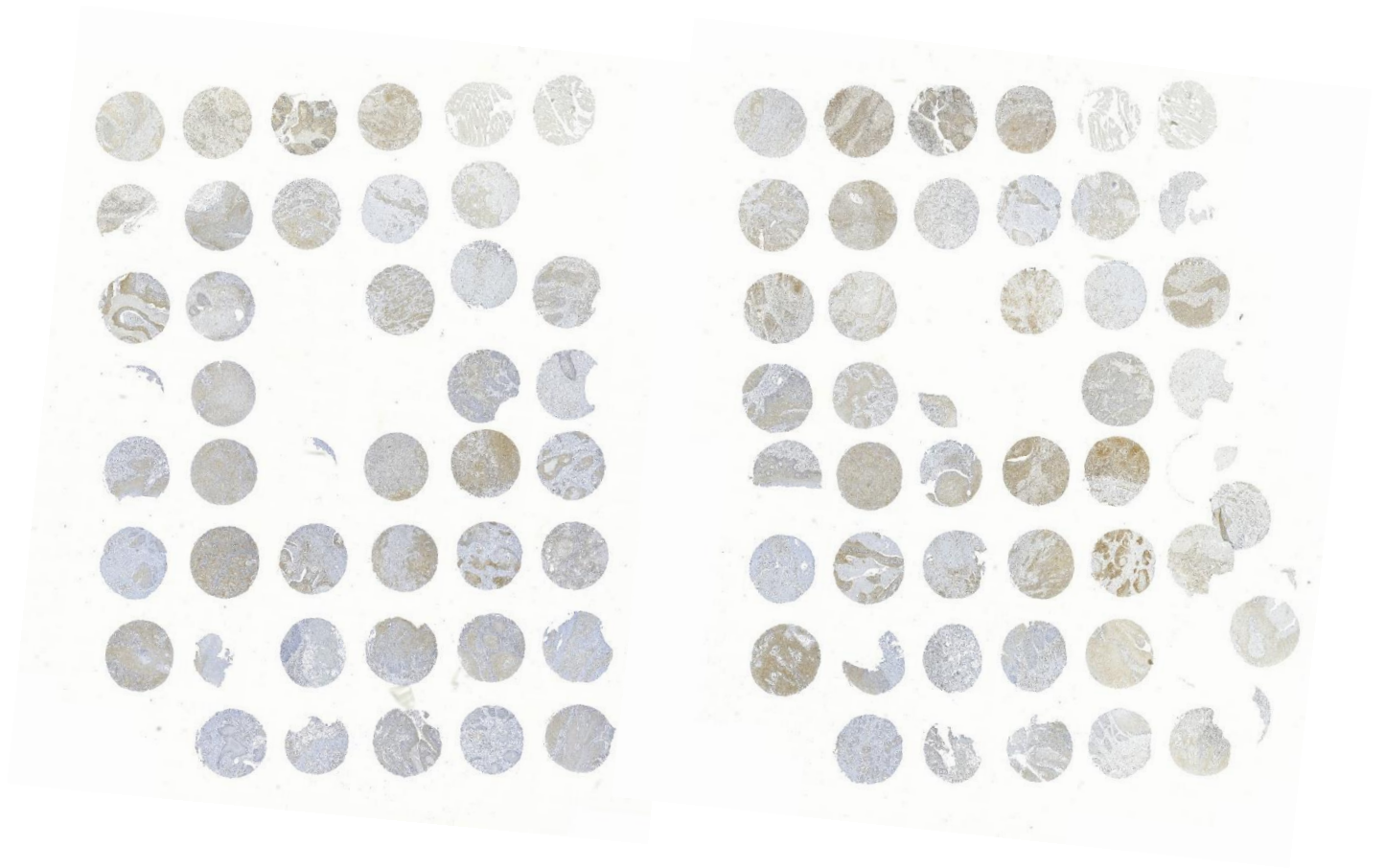


Abbildung 5: *Übersicht eines Gewebe-Mikroarrays.*

3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

3.5.1 Methode

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird eingesetzt, um eine Antikörper- oder Antigenmengen in einer Lösung messen zu können. Hierfür werden Polymerplatten, meist aus Polystyrol, eingesetzt. Es werden, je nach Methode, ein oder mehrere Antikörper benötigt. Der erste Antikörper bindet das gesuchte Antigen spezifisch. Der zweite Antikörper interagiert mit dem ersten und katalysiert eine Farbreaktion. Durch meist photometrische Verfahren und Kalibrierungskurven lässt sich anschließend aus der Menge die Konzentration eines Antigens bestimmen. Auch bei dieser Methode gibt es unterschiedliche Formen der Ausführung (71).

3.5.2 Sandwich-ELISA

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wird mit Antikörpern (Capture Antibody) gegen das gesuchte Antigen beschichtet. Anschließend wird Probenmaterial in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und mit dem Antikörper inkubiert. Das in der Probe gelöste Antigen soll an den spezifischen Antikörper, mit dem die Platte beschichtet ist, binden. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Kavitäten der Platte gewaschen. Das ist nötig, um alle Antigene zu entfernen, die nicht gebunden werden konnten und um eine falsch-positive Reaktion zu vermeiden. Im Anschluss erfolgt die Zugabe eines ersten antigenspezifischen Antikörpers (Detection Antibody). Die Menge des gebundenen Antigens und des ersten antigenspezifischen Antikörpers korrelieren positiv miteinander. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der mit einem Enzym konjugiert wurde, hinzugefügt. Durch die enzymatische Funktion des zweiten Antikörpers kann ein zugegebener Farbstoff gespalten werden, sodass die optische Dichte (OD) des Kavitäteninhaltes photometrisch bestimmt werden kann. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve kann anschließend von der OD auf die Konzentration des Antigens geschlossen werden. Für die vorliegende Studie wurde ein Sandwich-ELISA verwendet (71).

3.5.3 Blutproben

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die zwischen 2020 und 2023 in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums der Universität des Saarlandes aufgrund eines oralen Plattenepithelkarzinoms operativ behandelt wurden. Ausschlusskriterien waren frühere onkologische Therapien und bösartige Tumorerkrankungen in der Vorgeschichte. Am Operationstag wurde den Patienten im Rahmen einer klinisch notwendigen venösen Blutentnahme ein zusätzliches Serumröhrchen (4,7 ml) abgenommen.

Die Probanden der Kontrollgruppe wurden in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität des Saarlandes akquiriert. Aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen wurden Probanden mit einer Krebserkrankung in ihrer Vorgeschichte, einer akuten Infektion sowie einer chronischen entzündlichen Erkrankung. Den Probanden wurde im Rahmen einer klinisch notwendigen venösen Blutentnahme ein zusätzliches Serumröhrchen abgenommen.

Nach Entnahme der Blutproben wurden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gelagert, bis das Serum geronnen war. Anschließend wurden die Röhrchen 15 Minuten bei 2500 g und RT zentrifugiert. Das Serum wurde in 400 µl großen Portionen in beschriftete Kryoröhrchen pipettiert und über Nacht in einem Mr. Frosty bei -80°C gleichmäßig gefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5.4 Durchführung

Zur Durchführung des ELISA wurde ein Sandwich-ELISA-Kit für HLA-E der Firma antibodies-online GmbH (Catalog No. ABIN6956585) verwendet. Im Kit enthalten waren eine mit Anti-HLA-E-Antikörpern beschichtete 96-Wellplatte, ein Standard-Verdünnungsmittel (0,02% Natriumazid), zwei pulverförmige Standards, von denen eines nach Lösung im Standard-Verdünnungsmittel eine HLA-E Konzentration von 800 pg/ml aufwies. Zudem war ein Nachweisreagenz A und ein Nachweisreagenz B, ein Assay-Verdünnungsmittel A (0,01% Natriumazid) und ein Assay-Verdünnungsmittel B (0,01% Natriumazid), ein Reagent-Verdünnungsmittel, TMB Substrate, eine Stop-Lösung (Schwefelsäure 1mol/L) und eine Spüllösung (TBS) enthalten. Das ELISA-Kit konnte soluble HLA-E- (sHLA-E)

Konzentrationen zwischen 6,25 und 400 pg nachweisen. Bis zur Verarbeitung wurden die 96 Well-Platte, das Nachweisreagenz A und B und die Standard-Verdünnungslösung bei -20°C gelagert. Die anderen Kit-Bestandteile konnten nach den Anweisungen des Herstellers bei 4°C aufbewahrt werden. Zunächst wurden die Serumproben, die in flüssigem Stickstoff gelagert werden, sowie alle Bestandteile des ELISA-Kits auf Raumtemperatur (RT) aufgewärmt. Dafür wurden die Serumproben bereits am Vortag des Versuchs aus dem flüssigen Stickstoff genommen und über Nacht bei 4°C gelagert. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurden sie auf RT aufgewärmt. Währenddessen wurden die Proben entsprechend einer zuvor festgelegten Reihenfolge beginnend mit der Verdünnungsreihe, die von hoher zu niedriger HLA-E Konzentration geplant wurde, sortiert (Abbildung 6).

Als nächstes wurde die Standardverdünnungsreihe vorbereitet. Hierfür wurde zunächst 1 ml der Standardlösung zum pulverförmigen Referenzstandard hinzugefügt und leicht geschüttelt, bis sich das Referenzstandard vollständig in der Standardlösung gelöst hatte. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Blasen oder Schaum auf der Referenzstandardlösung bildet. Die sHLA-E-Konzentration der Lösung der Referenzstandardlösung betrug 800 pg/ml. Anschließend wurden 8 Eppendorfgefäße vorbereitet und von 1 bis 8 durchnummeriert. In jedes Gefäß wurden 0,5 ml Standardlösung pipettiert. In das erste Eppendorfgefäß wurden zusätzlich 0,5 ml der Referenzstandardlösung pipettiert, sodass sich eine sHLA-E-Konzentration von 400 pg/ml ergab. Dies war der höchste Wert der Verdünnungsreihe. Im nächsten Schritt wurden 0,5 ml der 400 pg/ml-haltigen Lösung aus dem ersten Gefäß in das zweite Eppendorfgefäß pipettiert, sodass sich für das zweite Gefäß eine sHLA-E-Konzentration von 200 pg/ml ergab. Dieses Vorgehen wurde fortgeführt. Im dritten Eppendorfgefäß ergab sich folglich eine sHLA-E Konzentration von 100 pg/ml, im 4. Eppendorfgefäß waren 50 pg/ml sHLA-E enthalten. Das 5. Gefäß enthielt 25 pg/ml, das 6. 12,5 pg/ml und das 7. Gefäß schließlich 6,25 pg/ml sHLA-E. Das 8. Eppendorfgefäß enthielt lediglich die Standardlösung und diente als negativer Referenzwert.

Im Anschluss wurde das Detection Reagent A mit dem Assay Diluent A und das Detection Diluent B mit dem Assay Diluent B vermischt (je 1:100). Die Waschlösung wurde aus 580 ml destilliertem Wasser und 20 ml Wash Buffer hergestellt.

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde mit dem eigentliche Assay fortgefahren. Hierzu wurden die Kavitäten der 96-Well-Platte mit je 100 µl in der zuvor festgelegten Reihenfolge beginnend mit der Verdünnungsreihe, der Negativkontrolle und anschließend den Serumproben befüllt (Abbildung 6). Es erfolgte eine Inkubation der 96-Well-Platte bei 37°C für eine Stunde.

Anschließend wurde die Flüssigkeit durch Aufklopfen der Well-Platte auf eine saugfähige Unterlage aus den Kavitäten entfernt. Danach wurden je 100 µl der Detection Reagent A Working Solution in jede Kavität gegeben. Die 96-Well-Platte wurde erneut bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Die Lösungen wurden im Anschluss durch sanftes Aufklopfen auf eine saugfähige Unterlage aus den Kavitäten entfernt. Danach wurden die Wells mit jeweils 350 µl Spüllösung befüllt, die nach 1-2 Minuten wieder entfernt wurde. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Well-Platte umgedreht und leicht auf eine saugfähige Unterlage geklopft.

Anschließend wurden 100 µl Detection Reagent B Working Solution in jedes Well pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation der Platte bei 37°C für 30 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Kavitäten 5 Mal, wie bereits beschrieben, gewaschen. Nun wurden 90 µl Substrate Solution zu jeder Kavität hinzugegeben, wodurch sich der zuvor farblose Inhalt der Wells blau färbte. Es erfolgte eine Inkubation für 10-20 Minuten bei 37°C, wobei die Platte keinem Licht ausgesetzt werden durfte. Abschließend wurde in jede Kavität eine 50 µl Stop Solution pipettiert, wodurch ein Farbumschlag der Lösungen von blau zu gelb verursacht wurde. Mit Hilfe eines Kolorimeters wurde die Lichtabsorption der einzelnen Kavitäten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Abbildung 7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	400 pg/ml	200 pg/ml	100 pg/ml	50 pg/ml	25 pg/ml	12,5 pg/ml	6,25 pg/ml	Blank 0 pg/ml	Tumor 8	Tumor 10	Tumor 12	Tumor 13
B	Tumor 15	Tumor 16	Tumor 17	Tumor 19	Tumor 24	Tumor 25	Tumor 26	Tumor 28	Tumor 29	Tumor 31	Kontrolle 32	Kontrolle 33
C	Tumor 34	Kontrolle 35	Tumor 36	Tumor 37	Kontrolle 39	Tumor 41	TAM Tumor 1	TAM Tumor 2	TAM Tumor 3	TAM Tumor 4	TAM Tumor 5	CONTR 1
D	TAM Tumor 6	CONTR 2	CONTR 3	TAM Tumor 8	Blank 0pg/ml	TAM Tumor 10	CONTR 4	CONTR 5	CONTR 6	TAM Tumor 11	TAM Tumor 13	TAM Tumor 14
E	CONTR 8	TAM Tumor 15	CONTR 9	TAM Tumor 16	CONTR 10	CONTR 11	TAM Tumor 17	CONTR 12	CONTR 13	TAM Tumor 18	CONTR 14	TAM Tumor 19
F	CONTR 16	CONTR 17	TAM Tumor 20	CONTR 18	CONTR 19	CONTR 20	CONTR 21	CONTR 22	CONTR 23	CONTR 24	CONTR 25	CONTR 26
G	CONTR 27	CONTR 28	CONTR 29	CONTR 30	CONTR 31	CONTR 32	CONTR 33	CONTR 34	CONTR 35	CONTR 36	CONTR 37	CONTR 38
H	CONTR 39	CONTR 40	TAM Tumor 21	400 pg/ml	200 pg/ml	100 pg/ml	50 pg/ml	25 pg/ml	12,5 pg/ml	6,25 pg/ml	Blank 0 pg/ml	Blank 0 pg/ml

Abbildung 6: Anordnung der Patientenproben auf der 96-Well-Platte. Auf den Positionen A1 bis A7 und H4 und H10 ist jeweils eine Standardverdünnungsreihe angelegt. Die Positionen A8, D5, H11 und H12 enthalten die Referenz-Leerwerte.

3.5.5 Auswertung

Die optische Dichte („Optical Density“ OD) der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm kolorimetrisch bestimmt (IMark™ Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) (Abbildung 7). Um aus der OD die sHLA-E Konzentration in pg errechnen zu können, wurde zunächst von den OD-Werten der einzelnen Kavitäten der OD-Messwert des Mittelwerts der Negativkontrolle subtrahiert.

$$\text{Relativer OD} = (\text{OD der einzelnen Kavität}) - (\text{OD Mittelwert der Negativkontrolle})$$

Anhand der relativen OD-Werte der Standardverdünnungsreihe (Positionen A1 bis A7) konnte in Excel 2016 eine Kalibrierungskurve dargestellt werden (Abbildung 8). Die Umrechnung der optischen Dichte in die Konzentration (pg/ml) erfolgte unter Zuhilfenahme der Kalibrierungskurve mittels linearer Interpolation nach der folgenden Formel:

$$y = y_1 + \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \cdot (x - x_1)$$

Durch die zuvor festgelegte Reihenfolge konnten die sHLA-E Konzentrationen den entsprechenden Probanden zugeordnet werden. Durch Dokumentation und Analyse der Werte im Statistikprogramm SPSS waren Zusammenhänge zwischen der sHLA-E Konzentration und den ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern erkennbar.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>	Infinity	2,08	1,146	0,71	0,394	0,192	0,168	0,163	0,206	0,104	0,608	0,25
<i>B</i>	0,708	0,193	0,696	0,098	0,209	0,169	0,516	0,259	0,171	0,295	0,126	0,059
<i>C</i>	0,446	0,215	0,175	0,083	0,475	0,151	0,106	0,174	0,124	0,09	0,501	0,059
<i>D</i>	0,244	0,393	0,376	0,172	0,145	0,19	0,499	0,347	0,368	0,104	0,142	0,574
<i>E</i>	0,16	0,33	0,426	0,105	0,174	0,424	0,231	0,195	0,498	0,169	0,101	0,119
<i>F</i>	0,149	0,39	0,103	0,061	0,47	0,357	0,41	0,264	0,148	0,291	0,548	0,238
<i>G</i>	0,568	0,826	0,554	0,37	0,417	0,7	0,554	0,211	0,497	0,164	0,197	0,328
<i>H</i>	0,826	0,172	0,194	2,863	2,096	1,214	0,702	0,368	0,183	0,164	0,16	0,155

Abbildung 7: Tabellarische Darstellung des Ausgabeblatts des Programms *Microplate Manager Software 6*. Zu sehen sind die optische Dichte (OD) der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm. A1 bis A7 bilden die Verdünnungsreihe, wobei A1 der Konzentration von 400 pg/ml, A2 200 pg/ml, A3 100 pg/ml, A4 50 pg/ml, A5 25 pg/ml, A6 12,5 pg/ml und A7 6,25 pg/ml zugeordnet werden. Die Position A8 dient als Referenzleerwert. Die Patientenproben bekleiden die Positionen A9 bis F.

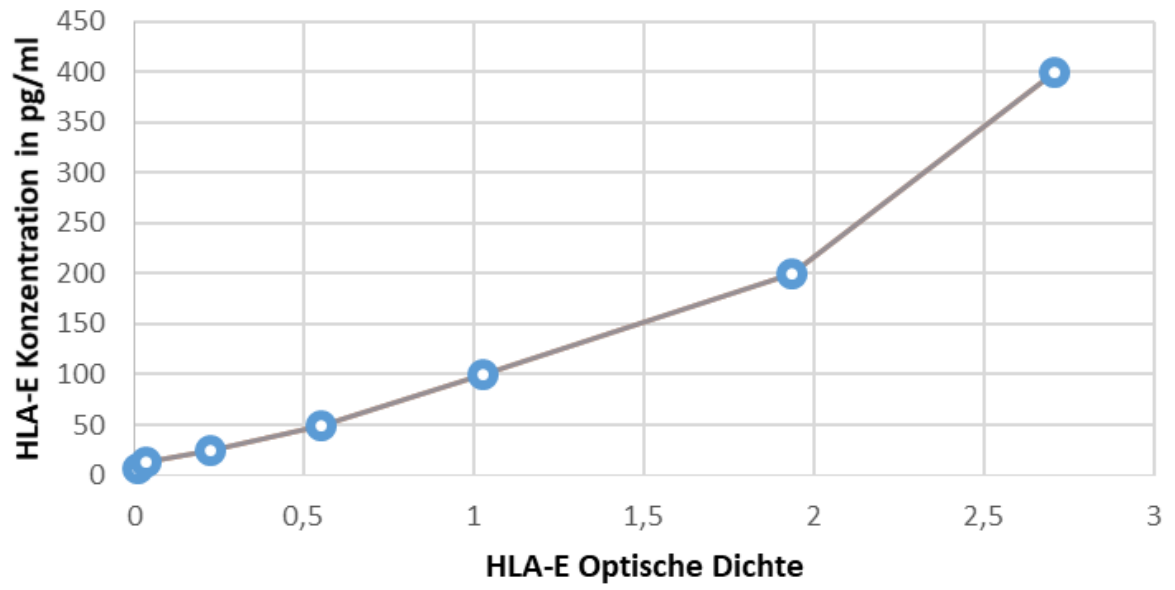


Abbildung 8: Kalibrierungskurve. Auf der x-Achse wird die optische Extinktion abgetragen. Die y-Achse zeigt die HLA-E-Konzentration in pg/ml.

3.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen der TMA- und ELISA-Auswertungen wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics 28.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. In der deskriptiven Statistik der TMA-Kohorte wurden sowohl die absoluten Zahlen als auch die prozentualen Werte mit der einfachen Standardabweichung für die untersuchten Parameter angegeben. Mit dem Rangkorrelationstest nach Spearman wurden Zusammenhänge zwischen zwei verschiedenen Variablen untersucht. Überlebensanalysen wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt und durch einen Log-Rank-Test auf ihre Signifikanz geprüft. Variablen mit einem potenziell prognostischen Wert wurden mittels multivariater Cox-Regression auf ihre unabhängige Aussagekraft überprüft.

Aufgrund der geringeren Probandenanzahl wurde die ELISA-Kohorte zunächst durch den Kolmogorov-Smirnov- und den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Die deskriptive Statistik und die Korrelationsanalysen wurden analog zu denen der TMA-Kohorte durchgeführt. Da die sHLA-E- Werte der ELISA-Kohorte nicht normalverteilt waren, wurde für Analysen von unabhängigen Stichprobenpaare der Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.

3.7 Material

Verwendete Materialien wurden im tabellarischen Anhang (Kapitel 7) systematisch geordnet und aufgelistet.

4 Ergebnisse

4.1 Gewebe-Mikroarray

4.1.1 Klinische und histopathologische Parameter der Patientenkohorte

Es wurde eine Kohorte von insgesamt 222 Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Oral squamous cell carcinoma, OSCC), die primär chirurgisch therapiert wurden, retrospektiv analysiert. Neben einer deskriptiven Beschreibung des Patientenkollektivs sollte der prognostische Wert der HLA-E-Expression auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht werden.

Es wurden folgende klinisch-pathologische Parameter analysiert: Geschlecht, Alter, Lokalisation, Histologie, TN-Klassifikation, UICC-Stadium, Grading und das Auftreten von Rezidiven (Tabelle 5). Die Kohorte bestand aus 137 männlichen (61,7 %) und 85 weiblichen (38,3 %) Patienten. Das Alter reichte von 27 bis 88 Jahre. Das Durchschnittsalter betrug 64 Jahre (Tabelle 4). 109 (49,1 %) Patienten waren jünger und 113 (50,9 %) Patienten älter als 64 Jahre. Alle Tumore wurden nach dem klinischem Staging und der histopathologischen Untersuchung als orale Plattenepithelkarzinome (OSCC) klassifiziert und waren in der Mundhöhle lokalisiert. Die T-Klassifikation war wie folgt verteilt: 82 (37 %) Patienten wiesen das Stadium T1 und 72 (32,4 %) Patienten das Stadium T2 auf. Das Stadium T3 war durch 8 (3,6 %) Patienten vertreten. Bei 60 (27 %) Patienten wurde das Stadium T4 diagnostiziert. Während 147 (66,2%) Patienten frei von Lymphknotenmetastasen waren, zeigten 75 (33,8%) Patienten positive Lymphknoten. Abgeleitet von der TN-Klassifikation wurde das UICC-Stadium I bei 69 Probanden (31,1%) diagnostiziert. 44 Probanden zeigten das Stadium II (19,8%) und 23 das Stadium III (10,4%). Das Stadium IV wurde durch 86 Probanden (38,7%) vertreten. Tabelle 5 zeigt einen Überblick über die Verteilung der klinischen-pathologischen Parameter.

Tabelle 4: Deskriptive Statistik über die Altersverteilung der TMA-Kohorte.

	<i>N</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SD</i>
<i>Alter</i>	222	27	88	64	11,101

Tabelle 5: Überblick über die klinisch-pathologischen Parameter der untersuchten TMA-Kohorte.

<i>Charakteristika</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl (Prozent)</i>
<i>Geschlecht</i>	Männer	137 (61,7)
	Frauen	85 (38,3)
<i>Alter</i>	< 64 Jahre	109 (49,1)
	> 64 Jahre	113 (50,9)
<i>Lokalisation</i>	Mundhöhle	222 (100)
<i>Histologie</i>	Plattenepithelkarzinom	222 (100)
<i>T-Klassifikation</i>	1	82 (37)
	2	72 (32,4)
	3	8 (3,6)
	4	60 (27)
<i>N-Klassifikation</i>	Negativ	147 (66,2)
	Positiv	75 (33,8)
<i>UICC-Stadium</i>	I	69 (31,1)
	II	44 (19,8)
	III	23 (10,4)
	IV	86 (38,7)
<i>Grading</i>	1	17 (7,7)
	2	153 (68,9)
	3	46 (20,7)
	Fehlend	6 (2,7)
<i>Rezidiv</i>	Ja	39 (17,6)
	Nein	183 (82,4)

Abkürzungen: UICC= Union Internationale Contre le Cancer

4.1.2 Variable „HLA-E hoch“

Die Gewebe-Mikroarrays des retrospektiv betrachteten Patientenkollektivs wurden mit einem HLA-E-Antikörper angefärbt. Für jeden Patienten wurden zwei Tumorstanzen angefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der gefärbten Zellen (Kategorie A) sowie die Intensität der Färbung (Kategorie B) ausgewertet (Siehe Material und Methodik, Kapitel 3.4.3 „Auswertung der Immunhistochemie“). Durch das Anfärben beider Tumorstanzen pro Patient erhielt jeder Patient sowohl für die Kategorie A als auch für die Kategorie B zwei Bewertungen, die nicht identisch sein mussten. Um aus diesem doppelten Datensatz einen einfachen Datensatz zu erhalten, wurden die Daten im Statistikprogramm SPSS aggregiert. Dadurch ließ sich das Spektrum der ganzen Zahlen, das von 1 bis 4 reichte, das für die Auswertung der Anzahl und der Intensität der gefärbten Zellen verwendet wurde, um dazwischenliegende Dezimalzahlen erweitert.

Anschließend wurde das Ergebnis, das bei der Auswertung der Anzahl der gefärbten Zellen erzielt wurde, mit dem Ergebnis der Intensitätsauswertung multipliziert, um einen Informationsverlust, der bei isolierter Betrachtung von nur einer der beiden Variablen entstehen würde, zu vermeiden. Das Produkt wurde als „HLA-E Expression“ bezeichnet. Durch das Multiplizieren von Dezimal- und ganzen Zahlen wurden 19 Ausprägungen der Variable „HLA-E Expression“ erzielt, die von 1 bis 16 reichten (Tabelle 6). Um eine bessere Übersicht zu gewähren und um ausreichend Beobachtungen für eine aussagekräftige statistische Analyse vorweisen zu können, wurden die Ausprägungen der Variable „HLA-E Expression“ in einem Rangverfahren in 20%-Schnitten zu 5 Rängen zusammengefasst. Da in dieser Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen einer sehr hohen HLA-E Expression und den klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Überleben untersucht werden sollte, wurden die HLA-E Ränge 1 bis 4 als „HLA-E niedrig“ und der HLA-E Rang 5 als „HLA-E hoch“ zusammengefasst.

Anschließend erfolgte eine Korrelation nach Spearman der Gruppen „HLA-E hoch“ und „HLA-E niedrig“ mit den klinisch-pathologischen Parametern des TMA-Kollektivs (Tabelle 7).

Tabelle 6: Ableitung der Variable „HLA-E hoch“ aus der HLA-E Expression und dem HLA-E Rang

<i>HLA-E Expression (HLA-E Anzahl x Intensität)</i>		<i>HLA-E Rang</i>		<i>HLA-E niedrig & hoch (Prozent)</i>	
<i>Anzahl x Intensität</i>	<i>Häufigkeit (%)</i>	<i>Häufigkeit (%)</i>		<i>Häufigkeit (%)</i>	
1	10 (5,3)	1	38 (20,2)	HLA-E niedrig	152 (80,9)
2,25	4 (2,1)				
3	3 (1,6)				
3,75	5 (2,7)				
4	16 (8,5)				
5	12 (6,4)	2	37 (19,7)		
6	12 (6,4)				
6,25	1 (0,5)				
7	6 (3,2)				
7,5	6 (3,2)				
8	9 (4,8)	3	31 (16,5)		
8,75	6 (3,2)				
9	11 (5,9)				
10	5 (2,7)				
10,5	22 (11,7)	4	46 (24,5)		
12	18 (9,6)				
12,25	6 (3,2)				
14	17 (9)	5	36 (19,1)	HLA-E hoch	36 (19,1)
16	19 (10,1)				

4.1.3 Korrelation zwischen der HLA-E Expression und den klinischen Parametern

Nach der immunhistochemischen Färbung der Gewebe-Mirkoarrays mit einem HLA-E Antikörper und der Auswertung der Färbung, erfolgte die Korrelation der klinisch-pathologischen Parametern mit der HLA-E Expression. Da es sich bei der HLA-E Expression um eine ordinal ausgeprägte Variable handelt, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Die Auswertung eines Zusammenhangs zwischen der Expression und dem Alter zeigte, dass ältere Patienten (>64 Jahre) eine signifikant höhere HLA-E-Expression aufwiesen als jüngere Patienten (<64) (Spearman's Rank Korrelation (SRC); $p=0,007$; $r=0,198$). Auch ein fortgeschrittenes T-Stadium (SRC; $p=0,003$; $r=0,217$), ein hohes UICC-Stadium (SCR, $p=0,002$, $r=0,22$) und das Auftreten von Rezidiven (SRC; $p=0,041$; $r=0,149$) war signifikant mit einer höheren HLA-E-Expression assoziiert. Tumoren des weichen Gaumens und der Wangenebene zeigten ebenfalls eine signifikant höhere HLA-E-Expression verglichen mit anderen Lokalisationen (SRC; $p=0,007$; $r=0,196$). Für alle untersuchten signifikanten Korrelationen ließ sich anhand des Rangkorrelationskoeffizienten ein mittlerer Zusammenhang zwischen dem jeweiligen klinisch-pathologischen Parameter und der HLA-E Expression feststellen.

Die Spearman'sche Korrelation der HLA-E-Expression mit dem Geschlecht ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Tumorpatienten (SRC; $p=0,994$). Auch zwischen den klinisch-pathologischen Parametern N-Klassifikation (SCR; $p=0,119$) und Grading (SRC; $p=0,647$) und der HLA-E Expression konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Tabelle 7 zeigt die absolute und prozentuale Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter getrennt nach der HLA-E-Expressionsstufe und wird durch den p-Wert sowie dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ergänzt.

Tabelle 7: Spearman-Korrelation der HLA-E-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom.

<i>Charakteristika</i>		<i>HLA-E niedrig</i>	<i>HLA-E hoch</i>	<i>p-Wert (Rho)</i>
<i>Geschlecht</i>	Männer	93 (80,9)	22 (19,1)	0,994 (0,001)
	Frauen	59 (80,8)	14 (19,2)	
<i>Alter</i>	< 64 Jahre	76 (89,4)	9 (10,6)	0,007* (0,198)
	> 64 Jahre	76 (73,8)	27 (26,2)	
<i>Lokalisation</i>	Mundboden	47 (90,4)	5 (9,6)	0,007* (0,196)
	Zunge	38 (86,4)	6 (13,6)	
	Unterkiefer	43 (71,7)	17 (28,3)	
	Oberkiefer	3 (75)	1 (25)	
	Unterlippe	0 (0)	1 (100)	
	Planum buccale	7 (63,6)	4 (36,4)	
	Weicher Gaumen	10 (83,3)	2 (16,7)	
<i>T-Klassifikation</i>	1	58 (90,6)	6 (9,4)	0,003* (0,217)
	2	52 (82,5)	11 (17,5)	
	3	4 (57,1)	3 (42,9)	
	4	38 (70,4)	16 (29,6)	
<i>N-Klassifikation</i>	Negativ	109 (83,8)	21 (16,2)	0,119 (0,114)
	Positiv	43 (74,1)	15 (25,9)	
<i>UICC-Stadium</i>	I	49 (89,1)	6 (10,9)	0,002* (0,22)
	II	38 (88,4)	5 (11,6)	
	III	16 (84,2)	3 (15,8)	
	IV	49 (69)	22 (31)	
<i>Grading</i>	1	12 (75)	4 (25)	0,647 (-0,034)
	2	102 (81)	24 (19)	
	3	33 (82,5)	7 (17,5)	
<i>Rezidiv</i>	Ja	24 (68,6)	11 (31,4)	0,041* (0,149)
	Nein	128 (83,7)	25 (16,3)	

Abkürzungen: UICC= Union Internationale Contre le Cancer, Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert, das Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert < 0,05

4.1.4 Einfluss der HLA-E Expression auf das progressionsfreie- und Gesamtüberleben

Im Anschluss wurde der Einfluss der HLA-E Expression auf das progressionsfreie (PFS) und Gesamtüberleben (OS) untersucht. Für beide Überlebensanalysen wurden jeweils eine Gruppe mit einer niedrigen und einer hohen HLA-E Expression in einer Kaplan-Meier-Kurve einander gegenübergestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Log-Rank Test (Abbildung 9).

Für Patienten, deren Tumoren eine hohe HLA-E Expression aufwiesen, konnte in der Überlebensanalyse ein signifikant verkürztes progressionsfreies Überleben (Log-Rank Test; $p=0,003$) verglichen mit Patienten, deren Tumoren eine hohe HLA-E Expression zeigten, gezeigt werden (Abbildung 9 A). Auch das Gesamtüberleben war bei Tumoren mit einer höheren HLA-E Expression signifikant kürzer als bei Patienten, die eine niedrigere HLA-E Expression aufwiesen (Log-Rank Test; $p=0,01$) (Abbildung 9 B).

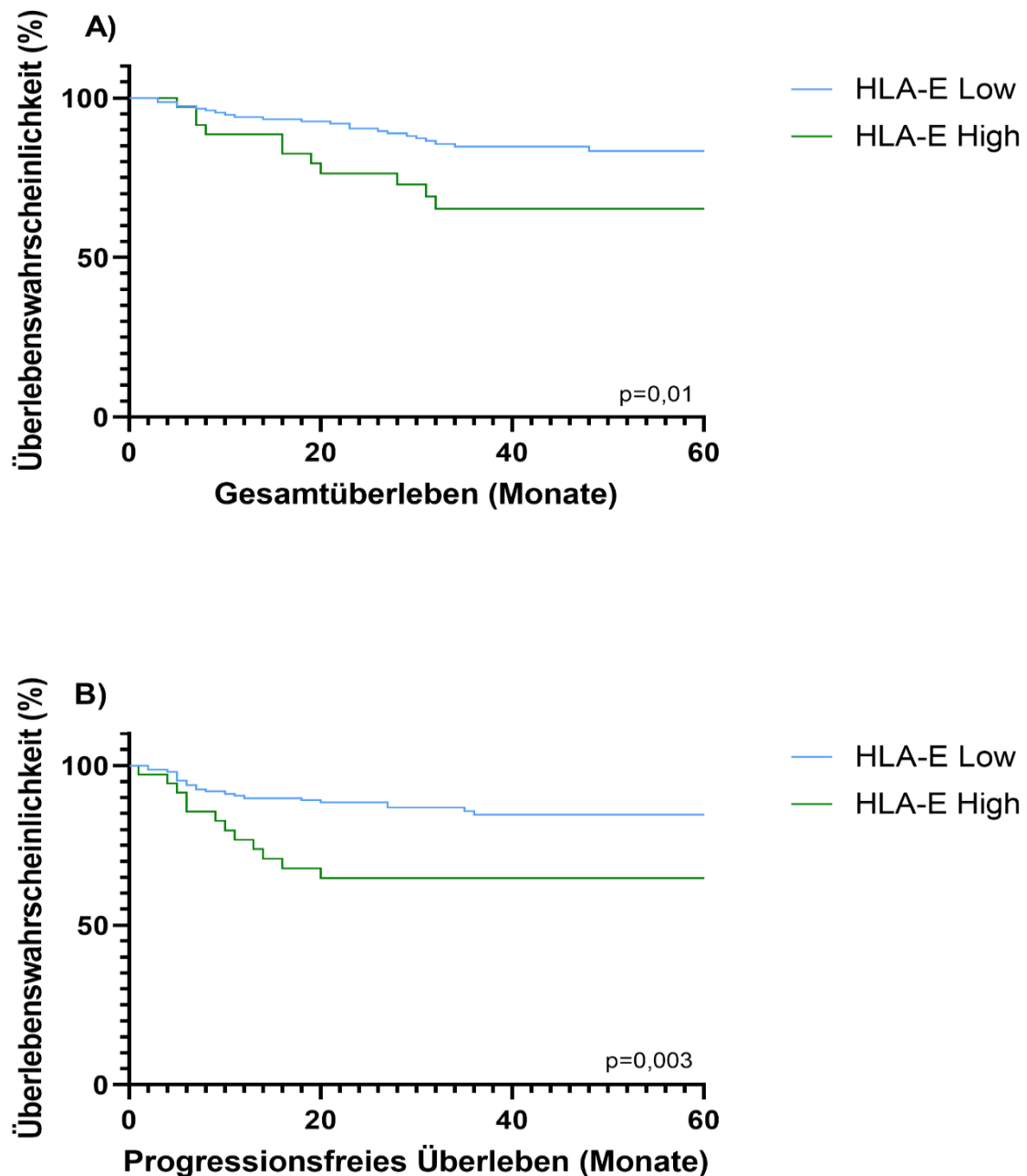


Abbildung 9:

A) In der Kaplan-Meier-Kurve ist das Gesamtüberleben (OS) von OSCC-Patienten abhängig von der HLA-E-Expression graphisch dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Log-Rank Test. Patienten, die eine hohe HLA-E-Expression auf dem Primärtumor aufwiesen, zeigten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als Patienten mit einer niedrigeren HLA-E Expression (Log-Rank Test; $p=0,01$).

B) Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das progressionsfreie Überleben (PFS) von OSCC-Patienten abhängig von der HLA-E-Expression. Die statistische Analyse erfolgte mittels Log Rank-Test. Patienten mit einer hohen HLA-E-Expression zeigten ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben als Patienten mit einer niedrigeren HLA-E Expression (Log-Rank Test; $p=0,003$).

4.1.5 Multivariate Analyse des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens

Die Kaplan-Meier-Kurve als deskriptive und univariate Methode zur Durchführung einer Überlebensanalyse zeigte ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) für Patienten mit hoher HLA-E-Oberflächenexpression. Weitere Faktoren, die auch Einfluss auf das Überleben haben könnten, blieben in der Kaplan-Meier-Analyse unberücksichtigt. Daher wurde der prognostische Wert der HLA-E Expression mit weiteren prognostisch bedeutsamen klinisch-pathologischen Parametern in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse auf seine Unabhängigkeit untersucht.

Die multivariate Cox-Regression wurde mit den relevanten klinischen Parametern Geschlecht, Alter, N-Klassifikation, UICC-Stadium und HLA-E-Expression durchgeführt (Tabelle 8). Die Analyse bestätigte die HLA-E Expression als unabhängigen prognostischen Marker in Bezug auf das PFS (HR 3,129; KI 1,443-6,787; $p=0,004$) und das OS (HR 2,328; KI 1,071-5,06; $p=0,033$). Auch die multivariate Analyse der N-Klassifikation ergab für die Patienten mit einer Lymphknotenmetastase ein signifikant schlechteres PFS und OS als für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (PFS: HR 4,764; KI 1,607-14,120; $p=0,005$; OS: HR 2,663; KI 1,086-6,526; $p=0,032$). Die Untersuchung der weiteren klinisch-pathologischen Parametern zeigten in dieser Kohorte keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das PFS und OS.

Tabelle 8: Multivariate Cox-Regression mit Geschlecht, Alter, N-Klassifikation, UICC-Stadium und HLA-E Expression.

<i>Charakteristika</i>		<i>Progressionsfreies Überleben</i>		<i>Gesamtüberleben</i>	
		<i>p-Wert</i>	<i>HR (95% KI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>HR (95% CI)</i>
<i>Geschlecht</i>	<i>Männer vs. Frauen</i>	0,677	0,862 (0,427-1,738)	0,83	0,925 (0,457-1,874)
<i>Alter</i>	<i>< 64 Jahre vs. > 64 Jahre</i>	0,350	0,712 (0,350-1,452)	0,46	0,988 (0,956-1,021)
<i>N-Klassifikation</i>	<i>Positiv vs. negativ</i>	0,005*	4,764 (1,607-14,120)	0,032*	2,663 (1,086-6,526)
<i>UICC-Stadium</i>		0,257	0,775 (0,498-1,205)	0,686	1,082 (0,738-1,586)
<i>HLA-E Expression</i>	<i>Hoch vs. Rest</i>	0,004*	3,129 (1,443-6,787)	0,033*	2,328 (1,071-5,060)

Abkürzungen: UICC=Union Internationale Contre le Cancer, HR= Hazard ratio, KI= Konfidenzintervall, Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert, das Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert < 0,05

4.2 ELISA

4.2.1 Klinische Parameter der prospektiven Patientenkohorte

Es wurden eine Kohorte bestehend aus 32 Patienten mit OSCC, die primär chirurgisch behandelt wurden, und 42 gesunden Probanden als Kontrollgruppe prospektiv untersucht. Es sollte der prognostische Wert der gelösten HLA-E Konzentration (soluble HLA-E, sHLA-E) geschlechterdifferenziert untersucht und das Patientenkollektiv deskriptiv beschrieben werden. Dabei wurden die klinisch-pathologischen Parameter Geschlecht, Alter, TN-Klassifikation und das UICC-Stadium betrachtet.

Die Patientengruppe setzte sich aus 18 männlichen (56,3%) und 14 (43,8%) weiblichen Teilnehmern zusammen. 13 Probanden (40,6%) waren zum Untersuchungszeitpunkt älter als 63 Jahre. 16 Patienten (50%) waren jünger als 65 Jahre. Bei einem Patienten fehlte die Altersangabe. Das Durchschnittsalter lag bei 63 Jahren, wobei die Altersspanne von 48 bis 93 Jahren reichte. Die Kontrollgruppe bestand aus 22 männlichen (52,4%) und 20 weiblichen (47,6 %) Teilnehmern. Zum Untersuchungszeitpunkt waren 13 Mitglieder (31 %) älter als 63 Jahre und 28 Mitglieder (66,7 %) jünger als 63 Jahre. Für einen Probanden fehlte die Altersangabe.

In der Tumorkohorte wiesen 22 (68,8%) Patienten positive HLA-E Werte im untersuchten Blutserum auf. Bei 10 (31,3%) Tumorpatienten konnte kein HLA-E im Serum nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe war HLA-E bei 35 (83,3%) Probanden nachweisbar. Bei 7 (16,7%) Probanden der Kontrollgruppe konnte kein HLA-E nachgewiesen werden. Das mittlere Alter betrug 59 Jahre. Die Altersspanne erstreckte sich von 20 bis 86 Jahre.

Sämtliche Tumoren wurden histopathologisch als Plattenepithelkarzinome klassifiziert und waren in der Mundhöhle lokalisiert. Die T-Klassifikation war wie folgt verteilt: T1 wurde bei 6 (18,8%), T2 und T3 wurde bei 7 Patienten diagnostiziert (T2: 21,9% und T3: 21,9%). 12 Patienten wiesen das Stadium T4 (37,4%) auf. 22 Probanden der Patientengruppe hatten negative Lymphknoten (68,8%). Bei 9 Probanden wurden Lymphknotenmetastasen (28,1%) diagnostiziert. Bei einem Patienten fehlten die Angaben zum Lymphknotenstatus (3,1%) Das UICC-Stadium I war bei 6 Patienten (18,8%) vertreten. 5 Probanden zeigten Stadium II und bei 7 Probanden wurde das Stadium III (UICC II: 15,6%; UICC III: 21,9%) klassifiziert. Das Stadium IV wurde bei 13 Patienten (40,6%) diagnostiziert. Bei einem Patienten fehlten

die Angaben zum UICC-Stadium. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter.

Da sowohl das Patienten- als auch das Kontrollkollektiv klein war, wurden die Daten zunächst mit dem Shapiro-Wilk (SW)- und Kolmogorov-Smirnov (KS)-Test auf Normalverteilung untersucht (Tabelle 10). Die Testergebnisse zeigten, dass keine Normalverteilung der Daten für die sHLA-E-Konzentration vorlag (KS $p < 0,001$; SW $p < 0,001$). Daher wurden zur Datenanalyse nur Tests für nicht-normalverteilte Daten verwendet.

Tabelle 9: Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter der Patienten- und der Kontrollgruppe der Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kohorte.

<i>Charakteristika</i>		<i>Tumorgruppe</i>	<i>Kontrollgruppe</i>
<i>Geschlecht</i>	Männer	18 (56,3)	22 (52,4)
	Frauen	14 (43,8)	20 (47,6)
<i>Alter</i>	> 65	13 (40,6)	13 (31)
	< 65	16 (50)	28 (66,7)
	Fehlend	3 (9,4)	1 (2,4)
<i>HLA-E</i>	Positiv	22 (68,8)	35 (83,3)
	Negativ	10 (31,3)	7 (16,7)
<i>Histologie</i>	Plattenepithelkarzinom	32 (100)	
<i>T-Stadium</i>	1	6 (18,8)	
	2	7 (21,9)	
	3	7 (21,9)	
	4	12 (37,4)	
<i>N-Stadium</i>	Positiv	9 (28,1)	
	Negativ	22 (68,8)	
	Fehlend	1 (3,1)	
<i>UICC</i>	I	6 (18,8)	
	II	5 (15,6)	
	III	7 (21,9)	
	IV	13 (40,6)	
	Fehlend	1 (3,1)	

Abkürzungen: UICC= Union Internationale Contre le Cancer

Tabelle 10: Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung der Variablen sHLA-E-Konzentration auf Normalverteilung.

	<i>Kolmogorov-Smirnov</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	<i>Statistik</i>	<i>Df</i>	<i>Signifikanz</i>	<i>Statistik</i>	<i>Df</i>	<i>Signifikanz</i>
<i>sHLA-E OD</i>	0,12	74	0,020	0,923	74	<0,001

4.2.2 Geschlechterspezifische Untersuchung der HLA-E Konzentration in der Tumor- und Kontrollgruppe

Um einen möglichen Einfluss des Geschlechts auf die HLA-E Konzentration im Blut der Tumor- und Kontrollgruppe zu untersuchen, wurden die Werte der sHLA-E Konzentration in ein Rangsystem überführt. Dabei wurden die Werte der sHLA-E Konzentration 5 unterschiedlichen Rängen zugeordnet (Rang 0 bis 4): Rang 0 beinhaltet alle negativen HLA-E Werte. Die positiven sHLA-Werte wurden in 25%-Schritten in 4 Ränge gegliedert: Dem 1. Rang wurden die sHLA-E Konzentrationen > 0 pg/ml und < 15 pg/ml zugeordnet. Zum 2. Rang wurden die sHLA-E Konzentrationen > 15 pg/ml und < 30 pg/ml zusammengefasst. Rang 3 umfasst sHLA-E Werte > 30 pg/ml und < 45 pg/ml. Die übrigen Werte wurden Rang 4 zugewiesen (Tabelle 11).

Anschließend wurde anhand der Ränge eine Kreuztabelle erstellt, die die Verteilung der Tumorpatientenkohorte und der gesunden Kontrollgruppe geschlechtsspezifisch darstellen sollte (Tabelle 12). Innerhalb der Tumorgruppe zeigte sich, dass Männer in 77,8% der untersuchten Fälle keine oder eine niedrige HLA-E Konzentration (Rang 0 und 1) aufwiesen. Nur ein Proband (4,76%) wies eine hohe HLA-E Konzentration (Rang 3 und 4) bei der Untersuchung auf.

Die Verteilung bei den weiblichen Tumorpatienten zeigte ein anderes Bild: 41,8% der weiblichen Tumorpatienten wiesen keine oder eine niedrige sHLA-E Konzentration bei der Untersuchung auf. 5 Probanden (35,7%) zeigten eine hohe sHLA-E-Konzentration im Blutserum.

Innerhalb der Kontrollgruppe wiesen 27,2 % der Männer keine oder eine niedrige sHLA-E Konzentration auf. 6 Probanden (27,2%) zeigten eine hohe sHLA-E Konzentration bei der Untersuchung. Das Verteilungsmuster innerhalb der weiblichen Kontrollgruppe zeigte, dass 45% der Kontrollgruppenprobandinnen keine oder eine niedrige sHLA-E-Konzentration aufwiesen. Bei 30% der Teilnehmerinnen konnte eine hohe sHLA-E Konzentration nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Einordnung der sHLA-E Konzentration in Ränge von 0 bis 4.

<i>sHLA-E Konzentration</i>	<i>Rang</i>	<i>sHLA-E Konzentration</i>	<i>Rang</i>	<i>sHLA-E Konzentration</i>	<i>Rang</i>
0	0	15,762	2	30	3
2,872	1	16,15	2	31,846	3
5,574	1	16,537	2	32,231	3
7,361	1	17,119	2	33,923	3
7,361	1	17,442	2	34	3
7,917	1	19,186	2	34,077	3
8,194	1	19,444	2	34,231	3
8,75	1	21,576	2	35,385	3
8,75	1	21,705	2	37,846	3
9,028	1	22,804	2	38,308	3
12,661	1	23,45	2	38,308	3
12,855	1	24,16	2	39,385	3
12,92	1	24,289	2	39,846	3
12,984	1	24,677	2	42,462	3
13,114	1	25,692	2	49,231	4
13,695	1	25,923	2	49,538	4
13,889	1	27,231	2	50,211	4
14,018	1	27,769	2	62,658	4
14,276	1	28,308	2	62,658	4
15,31	2	28,462	2		

Tabelle 12: Kreuztabelle. Die HLA-E-Ränge wurden gegen die untersuchten Kohorten (Patientengruppe und Kontrollgruppe) aufgetragen.

<i>Geschlecht</i>	<i>sHLA-E-Rang</i>	<i>Kohorte</i>	
		<i>Tumorpatienten (Prozent)</i>	<i>Kontrollgruppe (Prozent)</i>
<i>Männer</i>	0	7 (38,9)	3 (13,6)
	1	7 (38,9)	3 (13,6)
	2	3 (16,7)	10 (45,5)
	3	0 (0)	5 (22,7)
	4	1 (5,6)	1 (4,5)
<i>Frauen</i>	0	3 (21,4)	4 (20)
	1	3 (21,4)	5 (25)
	2	3 (21,4)	5 (25)
	3	4 (28,6)	4 (20)
	4	1 (7,1)	2 (10)

4.2.3 Geschlechterspezifische Untersuchung der sHLA-E Konzentrationen in der Tumorgruppe

Um die Beobachtungen aus Tabelle 12 genauer zu untersuchen, wurde ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Es wurde die sHLA-E-Konzentration im Blutserum geschlechtsdifferenziert in der Tumorkohorte untersucht. Ein Vergleich der sHLA-E Konzentration zwischen Männern und Frauen dieser Gruppe zeigte, dass Frauen der Tumorgruppe einen signifikant höheren mittleren Rang (20,18) aufwiesen als Männer (13,64) (Mann-Whitney-U Test: N: 32; U= 177,5; W=282,5; p=0,049) (Abbildung 10 B).

In einem weiteren Schritt wurde die geschlechterspezifischen Unterschiede der sHLA-E Konzentrationen zwischen Männern und Frauen der Kontrollgruppe analysiert. Dabei konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied der sHLA-E-Konzentrationen (Mittlerer Rang Männer: 22,48; Mittlerer Rang Frauen: 20,43) in der Kontrollgruppe festgestellt werden (Mann-Whitney-U Test: N= 42; U=198,5; W=408,5; p=0,587) (Abbildung 10 C).

4.2.4 Korrelation zwischen der sHLA-E Konzentration und den klinischen Parametern in der Tumor- und Kontrollgruppe

Anschließend wurden die klinischen Parameter Geschlecht, Alter, N-Klassifikation, T-Klassifikation und UICC-Stadium im Zusammenhang mit den löslichen HLA-E-Werten mit einer bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht (Tabelle 13). Lediglich für das Geschlecht konnte ein positiv signifikanter Zusammenhang mit der sHLA-E Konzentration festgestellt werden. Alle anderen klinisch-pathologischen Parameter zeigten keinen Zusammenhang mit der sHLA-E Konzentration. Auch in der geschlechterspezifischen Betrachtung konnten in der Spearman'schen Korrelation keine signifikanten Korrelationen zwischen der sHLA-E Konzentration und den klinisch-pathologischen Parametern aufweisen (Tabelle 14).

Tabelle 13: Spearman'sche Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter Geschlecht, Alter, N-Klassifikation und UICC-Stadium mit den sHLA-E-Werten des Patientenkollektivs

<i>Charakteristika</i>	<i>Spearman's Rho</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Geschlecht</i>	0,357	0,045*
<i>Alter (>65, <65)</i>	0,202	0,294
<i>T-Hoch/Niedrig</i>	0,068	0,711
<i>N positive/negativ</i>	-0,115	0,546
<i>UICC</i>	0,031	0,869

Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert, das Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert < 0,05

Tabelle 14: Spearman'sche Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter Alter, N-Klassifikation und UICC-Stadium mit den sHLA-E-Werten des Patientenkollektivs geschlechtsdifferenziert

	<i>Charakteristika</i>	<i>Spearman's Rho</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Frauen</i>	UICC	0,16	0,584
	Alter (>65, <65)	0,134	0,662
	T-Hoch/niedrig	0,146	0,618
	N positive/negativ	0,061	0,842
<i>Männer</i>	UICC	-0,118	0,651
	Alter (>65, <65)	-0,064	0,813
	T-Hoch/Niedrig	-0,43	0,865
	N positive/negativ	-0,227	0,381

4.2.5 Vergleich der sHLA-E Konzentration zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe

In einem weiteren Schritt wurde die sHLA-E Konzentration der Tumorgruppe mit der sHLA-E Konzentration der Kontrollgruppe verglichen, wofür ein Mann-Whitney-U Test verwendet wurde. Der Test zeigte, dass die sHLA-E Konzentration in der Kontrollgruppe signifikant höher war als die sHLA-E Konzentrationen der Tumorgruppe (N=74; U=461; W=989; p=0,021) (Abbildung 10 A). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass es einen geschlechtlichen Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen Männern und Frauen gab: Während bei Männer eine signifikant niedrigere sHLA-E Konzentration im Serum der Tumorgruppe nachweisbar war als in der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test: N=40; U=312,5; W=565,5; p=0,001) (Abbildung 10 E), konnte bei Frauen kein Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen Tumor- und Kontrollgruppe festgestellt werden (Mann-Whitney-U Test: N=34; U=134; W=353; p=0,916) (Abbildung 10 D). In der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der sHLA-E-Konzentration zwischen den männlichen und weiblichen Probanden festgestellt werden (Mann-Whitney-U Test: N: 42; U= 198,5; W=408,5; p=0,587) (Abbildung 10 C).

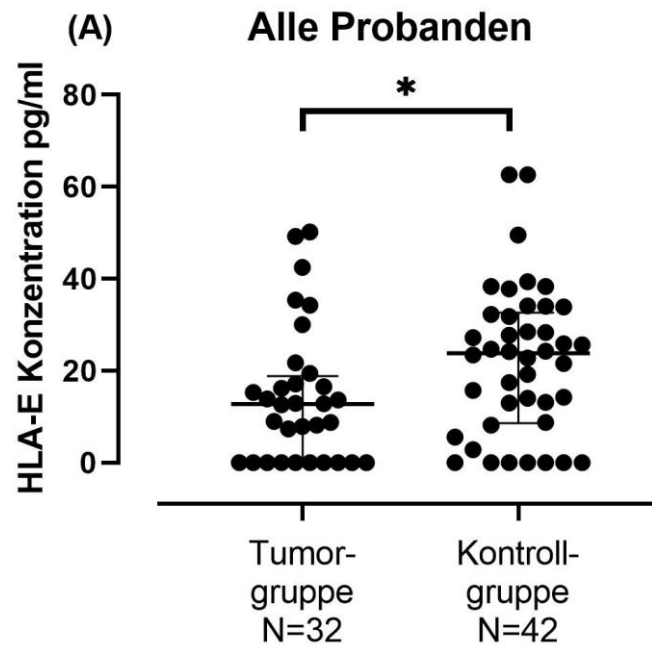
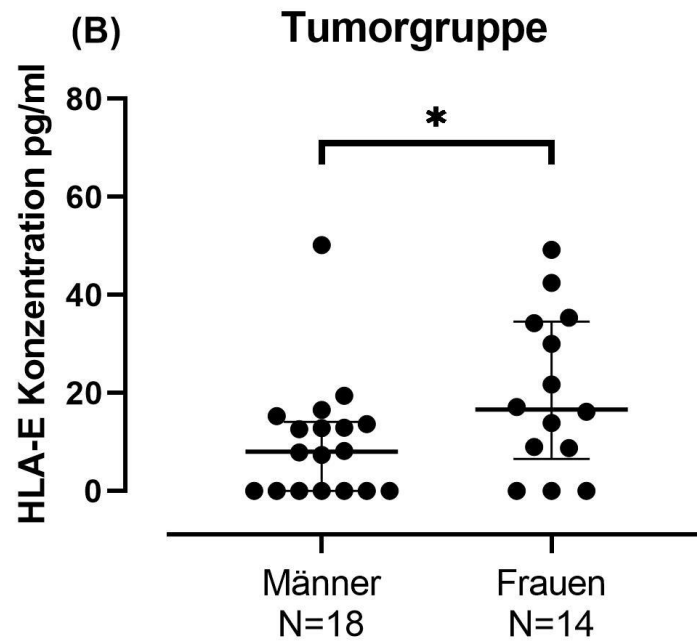
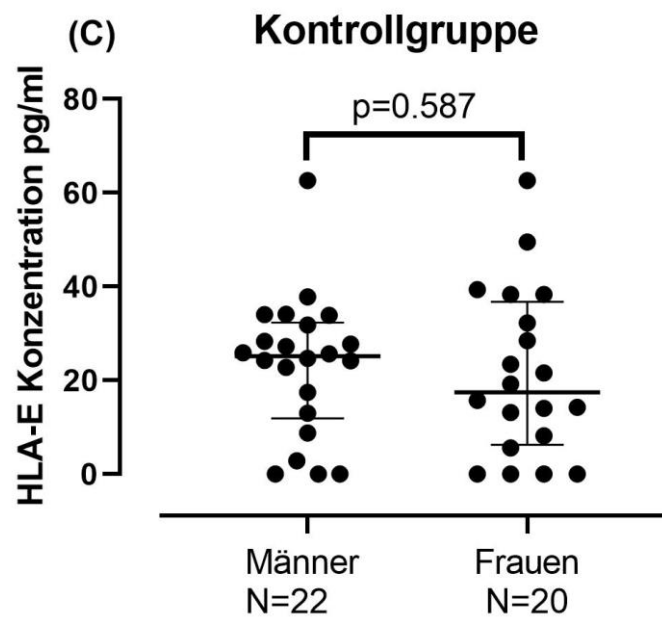


Abbildung 10: Vergleich der sHLA-E-Konzentrationen zwischen verschiedenen Gruppen. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Der Median ist durch einen fetten horizontalen Balken dargestellt. Der Interquartilsbereich ist durch die Whisker gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Sternchen markiert. * kennzeichnet einen p-Wert $< 0,05$. *** kennzeichnet einen p-Wert $< 0,001$.

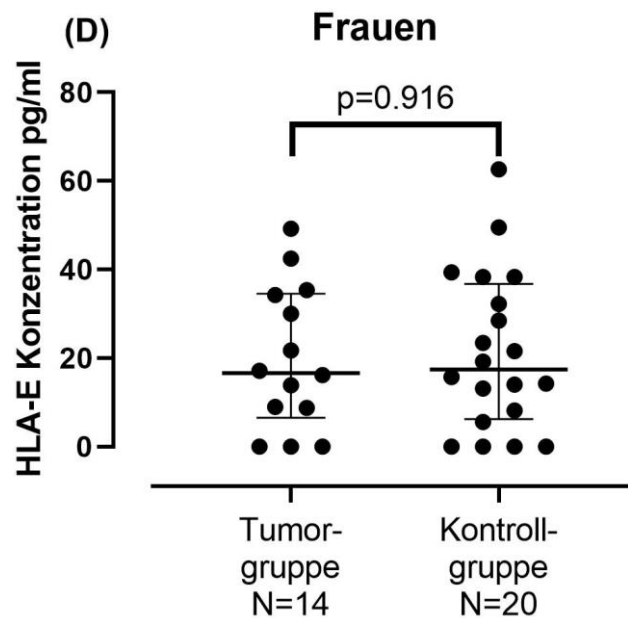
A) Streudiagramm, das die Unterschiede in den sHLA-E-Werten zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe zeigt. Der Mann-Whitney-U Test ergab eine signifikant höhere sHLA-E-Konzentration in der Kontrollgruppe als in der Tumorgruppe ($p=0,021$).



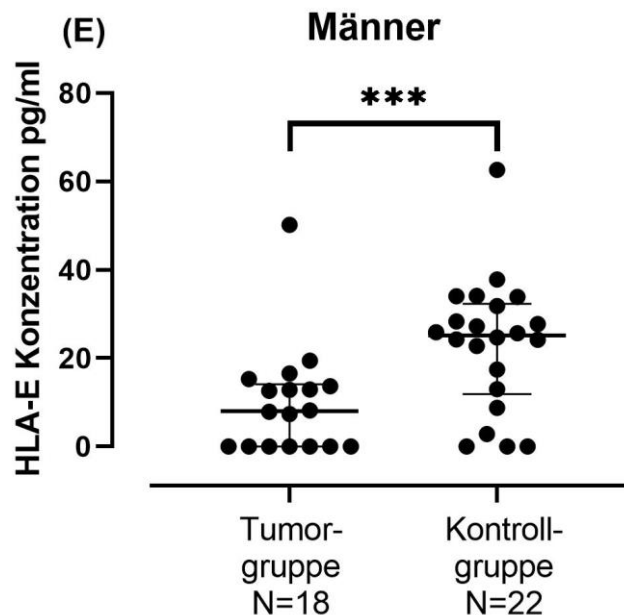
B) Das Streudiagramm zeigt die sHLA-E-Konzentrationen von Frauen und Männern in der Tumorgruppe. Der Mann-Whitney-U Test ergab eine signifikant höhere sHLA-E-Konzentration bei Frauen als bei Männern ($p=0,049$).



C) Das Streudiagramm zeigt die sHLA-E-Konzentrationen von Frauen und Männern in der Kontrollgruppe. Der Mann-Whitney-U Test ergab keinen Unterschied in der sHLA-E-Konzentration zwischen Frauen und Männern der Kontrollgruppe ($p=0,587$).



D) Streudiagramm, das die Unterschiede in den sHLA-E-Konzentrationen zwischen den weiblichen Probanden in der Tumorgruppe und den weiblichen Probanden in der Kontrollgruppe zeigt. Der Mann-Whitney-U Test zeigte keine Unterschiede in der sHLA-E-Konzentration bei den Frauen der Tumorgruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ($p=0,916$).



E) Streudiagramm, das die Unterschiede in den sHLA-E-Werten zwischen den männlichen Probanden der Tumorgruppe und den männlichen Probanden der Kontrollgruppe zeigt. Der Mann-Whitney-U Test ergab eine signifikant niedrigere sHLA-E-Konzentration bei den männlichen Probanden der Tumorgruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ($p=0,001$).

5 Diskussion

Plattenepithelkarzinome (OSCC) der Mundhöhle gehören nach wie vor zu den häufigsten Tumorentitäten weltweit. Die Prognose ist mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 62% bei Frauen und 52% bei Männern eher schlecht, was an dem häufigen Auftreten von Rezidiven und dem Auftreten von Zweittumoren liegt (108).

Orale Plattenepithelkarzinome treten insbesondere bei Männern ab einem Alter von 55 Jahre mit einem chronischen Nikotin- und/oder Alkoholabusus in der Krankengeschichte auf. Neben dem Noxenabusus als klassischen Risikofaktor für die Entwicklung von oralen Plattenepithelkarzinomen spielt, insbesondere bei den Frauen, auch das Alter eine relevante Rolle (76): Durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft erkranken immer häufiger ältere Menschen ohne das Zuwirken der klassischen Risikofaktoren an dieser Tumorentität. Im Gegensatz zu den Noxen-begünstigten Tumoren, die vermehrt bei Männern auftreten, sind von den altersassoziierten Tumoren eher Frauen betroffen.

Nach wie vor bildet die operative Entfernung der Tumormasse, oft begleitet durch eine (neo-)adjuvante Radio(-chemo) -Therapie, den Goldstandard des therapeutischen Vorgehens. In den letzten Jahren kamen mit den Immuncheckpoint-Inhibitoren eine neue Säule zu diesem Therapiekonzept hinzu: Der PD-L1 Hemmer Pembrolizumab ist seit wenigen Jahren für die Therapie metastasierter und/oder rezidivierender oraler Plattenepithelkarzinome zugelassen (77). Mit Monalizumab, einem Antikörper, der auf die Blockade der hemmenden HLA-E – NKG2A-Achse der Immunzellen abzielt, befindet sich ein neuer Immuncheckpoint-Inhibitor in klinischen Studien. Allerdings wirken Immuncheckpoint-Inhibitoren nur bei einem kleinen Teil der behandelten Patienten (dauerhaft). Auch zwischen Männern und Frauen bestehen Unterschiede in der Ansprache auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren: Männer sprechen besser auf eine alleinige Therapie mit ICIs an, während Frauen mehr von einer Kombination aus ICIs und der klassischen Chemotherapie profitieren.

Sowohl das gehäufte risikofaktorenunabhängige Auftreten von OSCC bei Frauen im fortgeschrittenen Alter als auch das unterschiedliche Ansprechen von Männern und Frauen auf die Therapie mit ICIs lässt Unterschiede in der antitumoralen Immunantwort von Männern und Frauen vermuten.

Die Immunhistochemie eines Gewebe-Mikroarrays bietet eine gute Möglichkeit zur geschlechterspezifischen Untersuchung der Expression von Immuncheckpoints auf Tumorzellen.

Allerdings darf der Tumor nicht isoliert betrachtet werden: Eine Krebserkrankung wird zunehmend als eine systemische Erkrankung verstanden, sodass den Interaktionen zwischen dem Tumor, dem peritumoralen Gewebe und den Immunzellen immer mehr wissenschaftliches Interesse zugeschrieben wird. Folglich ist es von großer Bedeutung sowohl die Immunescape-Mechanismen der Tumorzellen regional als auch mögliche globale Einflüsse auf die Immunantwort geschlechterspezifisch zu untersuchen.

5.1 Methodenauswahl und Grenzen

Seit ihrer ersten dokumentierten Anwendung im Jahr 1942 (27) hat sich die Immunhistochemie als eine der gängigsten Methoden in der Diagnostik und der Wissenschaft etabliert. Durch die Bindung von Antikörpern an spezifische Antigene ermöglicht sie die visuelle Darstellung der Verteilung und der Lokalisation zellulärer Bestandteile.

Die Immunhistochemie bietet den Vorteil, dass in Formalin fixierte und paraffinierte Proben verwendet werden können. Somit besteht die Möglichkeit, Proben einzulagern und zu einem späteren Zeitpunkt zu färben (68). So steht eine ausreichende Probandenzahl für eine aussagekräftige statistische Analyse, auch bei der Untersuchung seltener Gewebeanomalien, zur Verfügung. Darüber hinaus ist die Methode relativ kostengünstig und zeitsparend. Allerdings steht nicht für jedes Antigen ein passender Antikörper zur Verfügung. Insbesondere weisen neu verfügbare Antikörper im Verlauf häufig eine schlechtere Spezifität auf als anfänglich vermutet. Weithin verlieren paraffinierte Gewebeschnitte nach einiger Zeit ihre Antigenität. Antigene lassen sich durch ihre spezifischen Antikörper schlechter nachweisen (45), was insbesondere bei direkten Vergleichen der Färbung verschieden alter Schnittpräparate problematisch ist.

Ein Vorteil IHC gegenüber weiteren, proteinquantifizierenden Untersuchungen (z.B. Western Blot) liegt darin, dass die IHC eine genaue Lokalisation des Zielproteins in oder auf der Zelle erlaubt. Die Lokalisation ist wiederum bei der Interpretation der Ergebnisse im klinischen Kontext eine wichtige Information.

Wird für die Durchführung einer IHC ein Gewebe-Mikroarray verwendet, lassen sich die bereits genannten Vorteile noch durch weitere ergänzen: Bei einem TMA werden viele kleine Patientenproben

simultan untersucht. Dies resultiert in einer besseren Vergleichbarkeit der Färbungen, da die äußeren Faktoren (Einwirkzeiten, etc.) für alle Proben auf dem Objektträger exakt gleich sind (53). Durch das Aufbringen vieler Proben auf wenige Objektträger wird außerdem Zeit und Geld gespart, da nur ein Bruchteil der Materialien und Reagenzien benötigt wird. Zudem wird aus dem Donorblock nur eine geringe Materialmenge entnommen, sodass der Block für weitere Untersuchungen verwendet werden kann (53).

Allerdings weist ein TMA auch Grenzen auf, die bedacht werden müssen: Ein Nachteil eines TMAs ist die mangelnde Repräsentativität der einzelnen Stenzen (53). Die einzelnen Stenzen weisen einen kleinen Durchmesser auf und repräsentieren folglich nicht das komplette, oft heterogen gestaltete Gewebe. Durch die Betrachtung nur kleiner Gewebeanteile kann es somit zu einem Informationsverlust oder zu fehlerhaften Rückschlüssen kommen. Dieser Problematik kann entgegengewirkt werden, wenn mehr als nur eine Gewebestanze eines Patienten untersucht wird. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Zeitaufwand, der die Herstellung eines TMAs bedeutet. Neben dem Recherchieren geeigneter Probanden, das auch für das konventionelle Färben von Schnitten unerlässlich ist, müssen HE-Schnitte relevanter Gewebeproben mikroskopiert und, bei händischen Stanzverfahren, die zu stanzenden Areale markiert werden. Auch der eigentliche (händische) Stanzvorgang ist zeitintensiv, da jede Stanze einzeln vom Donorblock in den Akzeptorblock transferiert wird. Bei einer entsprechenden Gestaltung des TMA bietet diese Methode, insbesondere in Kombination mit der IHC, eine gute Möglichkeit Proteinexpressionen eines großen Patientenkollektivs schnell und kostengünstig zu untersuchen.

Eine IHC bietet allerdings nicht die Möglichkeit, Antigene in Körperflüiden quantifizieren zu können. Hierfür eignen sich Methoden wie ein ELISA. Verglichen mit einem Western Blot, der auch zur Quantifizierung von in Körperflüssigkeiten vorliegenden Substrate verwendet werden kann, ist die Durchführung eines ELISAs schnell und kostengünstig (6). Der Antigengehalt kann in vielen Proben gleichzeitig untersucht werden. Allerdings lässt sich in einem ELISA nur ein Antigen untersuchen. Ein Western Blot bietet die Möglichkeit der simultanen Untersuchung mehrerer Antigene (48). Da in dieser Studie die sHLA-E Konzentration im Serum vieler Probanden untersucht werden sollte, wurde sich aufgrund der genannten Vorteile für die Durchführung eines ELISAs entschieden.

5.2 HLA-E Expression als geschlechtsunabhängiger prognostischer Marker

Im ersten Teil der Studie wurde die HLA-E Expression anhand eines großen Kollektivs aus Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom untersucht. Anschließend erfolgte eine Analyse der klinisch-pathologischen Parameter des Patientenkollektivs zusammen mit den durch die immunhistochemisch gewonnenen Daten der HLA-E Expression. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte HLA-E-Expression mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert ist (T-Stadium (SRC; $p=0,003$), UICC-Stadium (SCR; $p=0,002$) und Rezidive (SRC; $p=0,041$)). In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen berichten Babay et al., dass eine erhöhte HLA-E Expression bei Patientinnen mit Eierstockkrebs mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium assoziiert ist (10). Es gibt allerdings auch widersprüchliche Studien, die keinen Zusammenhang zwischen der HLA-E Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern feststellen konnten (40, 43). Ein möglicher Grund für einen fehlenden Zusammenhang zwischen der HLA-E Expression und den von Gooden et al. untersuchten Zervixkarzinome könnte das frühe T-Stadium darstellen. Möglicherweise ist eine Korrelation zwischen der HLA-E-Expression und T-Stadium bei kleineren Tumoren weniger deutlich nachweisbar als bei Tumoren mit einem fortgeschrittenen T-Stadium. Zudem wurden in allen aufgelisteten Studien andere Tumorentitäten untersucht, sodass Vergleiche mit der vorliegenden Studie nur bedingt möglich sind.

In der folgenden Überlebensanalyse konnte gezeigt werden, dass das progressionsfreie und das Gesamtüberleben von Patienten mit einer hohen HLA-E Expression signifikant schlechter ist als das Überleben der Patienten mit niedrigerer HLA-E Expression (PFS: Log-Rank-Test: $p=0,003$, OS: Log-Rank-Test: $p=0,01$). In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnten Bossard et al. eine erhöhte HLA-E Expression bei Patienten mit kolorektalem Karzinom mit einer schlechteren Prognose assoziieren (18). Analoge Ergebnisse konnten auch in weiteren Studien gezeigt werden (52, 111). Allerdings gibt es auch Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen: Benevolo et al. konnten eine erhöhte HLA-E Expression mit einer besseren Prognose bei Patienten mit kolorektalen Karzinom assoziieren (14). In der Metastudie von Baysal et al. konnte eine erhöhte HLA-E Expression bei HNSCC Patienten mit einer besseren Prognose assoziiert werden (12). Auch für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wurde eine hohe HLA-E Expression als unabhängiger Marker für ein besseres Outcome bestätigt (109). Einen möglichen Grund für diese divergierenden Ergebnisse stellt die komplexe Funktion von HLA-E bei der Immunantwort dar: HLA-E kann sowohl hemmende als auch aktivierende Wirkungen auf natürliche Killerzellen (NK) haben. Xu et al. leiteten die abweichende prognostische Bedeutung einer hohen HLA-E-Expression aus einer möglichen unterschiedlichen Wirkung von HLA-E in verschiedenen Tumoren ab (109).

Die durchgeführte Multivariatanalyse bestätigte die HLA-E Expression als prognostisch unabhängigen Marker sowohl für das progressionsfreie Überleben (HR 3,129; KI 1,443-6,787; $p=0,004$) als auch für das Gesamtüberleben (HR 2,328; KI 1,071-5,06; $p=0,033$). Die klinischen Parameter T-Stadium und UICC-Stadium, anhand derer Therapieentscheidungen getroffen werden, konnten in der multivariaten Analyse nicht als unabhängige prognostische Marker bestätigt werden. Neben der HLA-E Expression konnte einzig der Lymphknotenstatus als unabhängiger prognostischer Marker für ein schlechteres PFS und OS bestätigt werden (PFS: HR 4,764; KI 1,607- 14,120; $p=0,005$; OS: HR 2,663; KI 1,086-6,526; $p=0,032$). Diese Erkenntnis unterstreicht die Wichtigkeit von HLA-E als Biomarker, um Patienten hinsichtlich ihrer Prognose zu klassifizieren. Hinzu kommt, dass sich mit Monalizumab ein Antikörper in der klinischen Studienphase befindet, der die Immunzell-inhibierende NKG2A – HLA-E-Achse blockiert. Eine hohe HLA-E Oberflächenexpression konnte bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich mit einer höheren Wirksamkeit von Monalizumab in Verbindung gebracht werden (60). So kommt der Bestimmung der Oberflächen-HLA-E Expression nicht nur eine prognostische Bedeutung zu, sondern könnte in Zukunft sowohl für die Therapieentscheidung als auch für das Abschätzen der Wirksamkeit einer Monalizumab-Therapie bei OSCC-Patienten bedeutend sein.

5.3 Soluble HLA-E ist in der Kontrollgruppe signifikant höher nachweisbar als in der Tumorgruppe

Im zweiten Teil der Studie sollte die lösliche Form von HLA-E (sHLA-E) im Blut eines kleineren Kollektivs aus Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom mittels ELISA untersucht und mit der sHLA-E Konzentration einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Ziel war es, potentielle sHLA-E Konzentrationsunterschiede zwischen der Tumor- und der gesunden Kontrollgruppe, insbesondere vor einem geschlechterdifferenzierten Hintergrund, zu untersuchen. Innerhalb der Tumorgruppe sollten die sHLA-E Konzentration mit den klinisch-pathologischen Parametern Geschlecht, Alter, T- und N-Klassifikation sowie dem UICC-Stadium korreliert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die sHLA-E Konzentration der Kontrollgruppe signifikant höher war als die sHLA-E Konzentration der Tumorgruppe (Mann-Whitney-U Test: $N=74$; $U=461$; $W=989$;

p=0,021). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich ein geschlechterspezifischer Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen Männern und Frauen: Während in der männlichen Tumorkohorte eine signifikant niedrigere sHLA-E Konzentration im Serum nachweisbar war verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test: N=40; U=312,5; W=565,5; p=0,001), konnte bei Frauen kein statistisch signifikanter Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen Tumor- und Kontrollgruppe festgestellt werden (Mann-Whitney-U Test: N=34; U=134; W=353; p=0,916).

Bislang gibt es nur wenige Studien, in denen die sHLA-E Konzentration im Blut von Probanden mit einer Tumorerkrankung mit der sHLA-E Konzentration im Blut von gesunden Kontrollgruppenprobanden verglichen wird (7, 73, 75). Wie die vorliegende Studie untersuchen auch diese Studien den Zusammenhang zwischen der sHLA-E Konzentration im Blut und dem Vorhandensein eines Tumors. Allerdings weisen diese Studien bedeutende Unterschiede auf verglichen mit der vorliegenden Studie: Es wurden andere Tumorentitäten und andere Körperfluide untersucht (73). Auch in der statistischen Auswertung gibt es Unterschiede: Die sHLA-Konzentrationen wurden weder in der Tumor- noch in der Kontrollgruppe geschlechterspezifisch betrachtet. Aufgrund dieser Unterschiede sollte ein direkter Vergleich der Ergebnisse der oben angeführten Studien mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie unterbleiben. Allerdings können die Studien Hinweis und Ideen für Interpretationsansätze liefern.

Die Ergebnisse dieser Studie erweitern somit das Spektrum der bisherigen Forschungsergebnisse: In der Studie von Allard et al. weisen Melanompatienten eine signifikant höhere sHLA-E Konzentration im Serum auf als die Probanden der gesunden Kontrollgruppe (7). Auch in weiteren Studien ist die sHLA-E Konzentration in der Tumorgruppe höher als die der Kontrollgruppe (73, 75). Allerdings wurde in der Studie von Morandi et al. die sHLA-E Konzentration im Blutplasma und nicht im –serum untersucht (73). Es wird jedoch nicht immer eine erhöhte sHLA-E Konzentration in der Tumorgruppe nachgewiesen: In einer anderen Studie zeigten Morandi et al., dass es keinen Unterschied zwischen der sHLA-E Konzentration im Serum von Neuroblastompatienten gibt verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Sie folgern daraus, dass Neuroblastomzellen eher nicht an der Freisetzung von sHLA-E beteiligt sind (74). Ähnliches konnte auch in der weiblichen Kohorte der vorliegenden Studie beobachtet werden: Zwischen der sHLA-E Konzentration der weiblichen Tumorpatienten und den weiblichen Teilnehmern der Kontrollgruppe konnte kein Unterschied in der sHLA-E Konzentration festgestellt werden.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Studie verglichen mit der aktuellen Literatur stellt die dort fehlende geschlechterspezifische Betrachtung der sHLA-E Konzentrationen in Tumor- und Kontrollgruppe dar. In der vorliegenden Studie konnten durch die geschlechterspezifische Aufschlüsselung signifikante Unterschiede in der sHLA-E Konzentration

zwischen Tumor- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Eine geschlechterundifferenzierte Betrachtung der klinischen Parameter verschleiern möglicherweise sHLA-E Unterschiede. Ein weiterer Grund für die divergierenden Ergebnisse der vorliegenden Studie verglichen mit weiteren Studien stellt die Tumorentität dar.

5.4 HLA-E Expression und sHLA-E Konzentration sind unabhängig voneinander

Ein positiv korrelierender Zusammenhang zwischen der membranständigen HLA-E Expression und der im Blut gelösten sHLA-E Konzentration scheint zunächst obligat. In der vorliegenden Studie konnte ein solcher Zusammenhang nicht festgestellt werden. Auch in der aktuellen Literatur lassen sich Beispiele für einen fehlenden Zusammenhang zwischen der Oberflächen-HLA Expression und der sHLA Konzentration im Blut finden: Bei einer Kohorte bestehend aus Patienten mit Magenkrebs konnten Farjandian et al. keinen Zusammenhang zwischen der HLA-G Expression und seiner gelösten Form feststellen (35). Auch zwischen der Oberflächenexpression von HLA-E und sHLA-E muss laut Kessler et al. (55) nicht unbedingt ein Zusammenhang bestehen.

Mögliche Gründe für diesen fehlenden Zusammenhang lassen sich in der Literatur finden. Dabei werden die Tumorumgebung und weitere, sHLA freisetzende, Zellen als Erklärungsansatz herangezogen. Des Weiteren sind auch Unterschiede in der Hochregulation von membranständigen HLA und der Freisetzung seiner gelösten Form denkbar. Farjandian et al. führen als Erklärungsansatz für einen fehlenden Zusammenhang zwischen der Oberflächen HLA-G Expression auf Magenkrebszellen und der im Blut gelösten Konzentration von sHLA-G eine Isoform von sHLA-G an, die von anderen Zellen freigesetzt wird (35). sHLA-G wird nicht nur von Tumorzellen freigesetzt. Auch CD 4⁺ T-Zellen können sHLA-G sekretieren (63). Für sHLA-E wäre ein ähnlicher Mechanismus denkbar: Coupel et al. konnten zeigen, dass in vitro die Freisetzung von sHLA-E auch durch endotheliale Zellen, die durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wurden, erfolgen kann. Einen weiteren Erklärungsansatz für den fehlenden Zusammenhang des membranständigen und gelösten HLA suchen Kessler et al. in der Tumorumgebung (55). Sie nehmen an, dass die sHLA Freisetzung solider Tumoren verglichen mit der sHLA Freisetzung hämatonkologischer Tumoren, die sHLA effektiver direkt in das Blut freisetzen, durch das tumorumgebende stromale Gewebe eingeschränkt sein könnte. Da orale

Plattenepithelkarzinome zu den soliden Tumoren gezählt werden, kann dieser Erklärungsansatz für den fehlenden Zusammenhang des membranständigen und der gelösten HLA-E berücksichtigt werden.

Zusätzlich zu den bereits genannten Punkten sollte die Regulation der HLA-E Expression und der sHLA-E Freisetzung berücksichtigt werden: Sowohl die Expression von HLA-E als auch die Freisetzung von sHLA-E werden von proinflammatorischen Zytokinen positiv beeinflusst (8). Allerdings muss beachtet werden, dass HLA-E vornehmlich durch proteolytische Spaltvorgänge, die durch Metalloproteasen wie MMP-9 (31, 97) und ADAM 17 (75) katalysiert werden, von der Zelloberfläche freigesetzt wird (Siehe Kapitel 2.2.2 „Lösliche HLA-E Moleküle“). Die Aktivität der MMPs lässt sich auf unterschiedlichen Ebenen regulieren: Über die Genexpression mit posttranskriptioneller Modifikation, über die Kompartimentierung und über aktivierende und hemmende Liganden. Solche Liganden, wie etwa die inhibitorischen Moleküle TIMS und $\alpha 2$ Makroglobulin, müssen keinen Einfluss auf die HLA- Expression haben. Sie scheinen aber Einfluss auf die Freisetzung von sHLA zu haben (66). Je nachdem, ob im Tumormilieu mehr aktivierende oder hemmende Faktoren vorhanden sind, kann dies ein Erklärungsansatz für den fehlenden Zusammenhang zwischen der Expression und der Freisetzung von HLA sein.

Diese Erklärungsansätze liefern mögliche Gründe, weshalb keine Korrelation zwischen der HLA-E Expression und der sHLA-E Konzentration bestehen muss. In der Literatur lassen sich zusätzlich Hinweise auf einen geschlechterabhängigen Einfluss auf die Aktivität der MMPs finden: Nilsson et al. konnten zeigen, dass das Sexualhormon Östrogen Einfluss auf die Regulation der MMP 9-Aktivität bei Brustkrebspatientinnen hat, wobei Östrogen mit einem verminderten Proteinlevel assoziiert wurde (39, 82).

5.5 sHLA-E als prognostischer Marker für Patienten mit OSCC

Unter einem prognostischen Marker wird eine Messgröße verstanden, die der Risikoabschätzung für das Auftreten zukünftiger Ereignisse, z.B. Rezidiven, oder dem Überleben dient (88). In ihrer Studie ziehen Morinaga et al. sHLA-E als prognostischen Marker bei Patienten mit Magenkarzinom in Betracht (75). Sie konnten zeigen, dass Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine signifikant höhere sHLA-E Konzentration aufweisen als Patienten in einem früheren Krankheitsstadium. Auch bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom ist sHLA-E im Blut nachweisbar. Es stellt sich daher die

Frage, ob sHLA-E auch als prognostischer Marker für Patienten mit OSCC in Betracht gezogen werden kann.

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der sHLA-E Konzentration im Blut und den klinisch-pathologischen Parametern, die mit der Tumoraggressivität assoziiert sind (T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium), gefunden werden (Kapitel 4.3.4, Tabelle 13). Aufgrund des kurzen Nachbeobachtungszeitraums kann zudem keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der sHLA-E Konzentration und dem progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben getroffen werden. Somit erfüllt sHLA-E die Funktion eines prognostischen Markers, wie sie von Riley et al. formuliert wurde (88), nicht. sHLA-E scheint daher als prognostischer Marker für Patienten mit OSCC ungeeignet zu sein.

Obwohl sHLA-E keinen prognostischen Wert für Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen zu haben scheint, sollte überlegt werden, ob er sich als potentieller Tumormarker für orale Plattenepithelkarzinome anbieten könnte. Unter einem Tumormarker wird ein Molekül verstanden, das bei neoplastischen Erkrankungen in veränderter Menge vorliegt. Ein Tumormarker sollte hoch spezifisch und sensitiv sein und das Ergebnis reliabel. Zudem sollte er organspezifisch sein und einen hohen prognostischen Wert aufweisen sowie mit dem Tumorstadium zusammenhängen. Allerdings erfüllt kein bisher bekannter Tumormarker alle Punkte (70). In der vorliegenden Studie ist die sHLA-E Konzentration der Tumorgruppe signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Diese Dynamik ist für einen Tumormarker eher untypisch, da häufig ein positiver Zusammenhang zwischen dem Tumorprogress und der Konzentration an Tumormarker festgestellt wird (37, 61, 94). Darüber hinaus sollte dem Fakt Beachtung geschenkt werden, dass dieser Unterschied vor allem durch die männlichen Probanden der Tumor- und Kontrollgruppe zustande kommt. Bei den weiblichen Teilnehmern der beiden Gruppen konnte kein Unterschied in der sHLA-E Konzentration festgestellt werden (Kapitel 3.2.5 Abbildung 10). sHLA-E würde als Tumormarker somit nur eine Teilmenge der möglichen Tumorpatienten mit einer ungewöhnlichen Dynamik repräsentieren. Wie bereits beschrieben hat die sHLA-E Konzentration bei Patienten mit OSCC keinen prognostischen Wert und weist keinen Zusammenhang mit dem Tumorstadium auf. Die sHLA-E Konzentration ist zudem nicht organspezifisch: Auch bei anderen Tumorentitäten wurde eine erhöhte sHLA-E Konzentration im Blutserum nachgewiesen (75, 98). Auch bei entzündlichen Erkrankungen wie den ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden (28) oder der Takayatsu Arteriitis (38) ist die sHLA-E Konzentration im Blut erhöht. Bezüglich der Spezifität, Sensitivität und Reliabilität müssen weitere Experimente in einem vergleichbaren Kollektiv durchgeführt werden. Folglich sind alle Punkte, die den Anspruch an einen Tumormarker definieren (88), nicht erfüllt. sHLA-E eignet sich folglich nicht als Tumormarker.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sHLA-E sowohl als prognostischer Marker als auch als Tumormarker für Patienten mit OSCC ungeeignet zu sein scheint. Allerdings fehlt in der vorliegenden eine im zeitlichen Verlauf longitudinale Bewertung der sHLA-E Konzentration. Weitere Untersuchungen, die die sHLA-E Konzentration über einen längeren Zeitraum im Zusammenhang mit dem Überleben untersuchen, würden eine sinnvolle Ergänzung dieser Arbeit darstellen.

5.6 Auswirkungen der sHLA-E Konzentrationen auf die Tumorgenese und den Gesamtorganismus geschlechterspezifisch betrachtet

Die genaue Funktion und Wirkung von sHLA-E ist noch nicht vollständig geklärt. sHLA-E scheint eine ähnliche Funktion zu haben wie sein membrangebundenes Äquivalent: Über eine Bindung der CD94/NKG2-Rezeptoren auf den NK- und CD8⁺ T-Zellen nimmt auch sHLA-E eine immunmodulierende Wirkung ein (104). Entsprechend der hohen Affinität von membranständigem HLA-E zum hemmenden CD94/NKG2A Rezeptorkomplex wirkt auch sHLA-E inhibierend auf die NK-Zell-Funktion.

Diese Wirkung von sHLA-E wird in der Literatur in Bezug auf den Tumor und auf den Organismus diskutiert: Morinaga et al. berichten in ihrer Studie von einem Zusammenhang zwischen sHLA-E und der Immunflucht. sHLAE scheint die NK-Zellfunktion einzuschränken und somit die immunologische Tumorabwehr zu hemmen. Coupel et al. (28) beleuchten in ihrer Studie jedoch einen weiteren Aspekt: Durch seine gelöste Form kann sHLA-E auch tumorfern wirken und somit Zellen vor einer überschießenden Immunreaktion bewahren.

Lokal am Tumor betrachtet scheint sHLA-E über den entsprechenden Immunflucht- Mechanismus eine tumorbegünstigende Wirkung zu haben. Bei Betrachtung des gesamten Organismus, insbesondere tumorferner Regionen, kann sHLA-E ein protektiver Effekt auf das gesunde Gewebe zugesprochen werden, der durch die Dynamik und Ortsungebundenheit von sHLA-E bedingt wird.

Vor diesem Hintergrund lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterschiedliche Interpretationsansätze zu, die sich auf mögliche Freisetzungsorte von sHLA-E beziehen: Wird angenommen, dass sHLA-E von den Tumorzellen freigesetzt wird, dann scheint die Tumorgenese in der weiblichen Kohorte keinen Einfluss auf die sHLA-E Freisetzung zu haben. Möglicherweise sind die

Zellen oraler Plattenepithelkarzinome, zumindest bei den weiblichen Tumorpatienten, eher nicht an der Freisetzung von sHLA-E beteiligt, wie es auch bei Morandi et al. für die sHLA-E Konzentration bei Neuroblastompatienten beschrieben wurde (74). Allerdings liefert dieser Interpretationsansatz keine Erklärung, weshalb die sHLA-E Konzentration der männlichen Tumorkohorte niedriger ist als die der Kontrollgruppe.

Wird angenommen, dass sHLA-E nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch durch aktivierte Endothelzellen (28) oder Makrophagen (22) (Siehe Einleitung (73)) freigesetzt wird, kann die erhöhte sHLA-E Konzentration der (männlichen) Kontrollgruppe verglichen mit der Tumorgruppe als ein regulärer Schutz des Organismus vor einer übermäßigen peripheren Immunreaktion verstanden werden. Eine niedrigere sHLA-E Konzentration in der männlichen Tumorkohorte verglichen mit der weiblichen Tumorgruppe (Mann-Whitney U-Test: N: 32; U= 177,5; W=282,5; p=0,049) (Abbildung 10 B) gibt einen Hinweis auf eine tumornahe geringere Immunzell-Supprimierung der männlichen Probanden verglichen mit den weiblichen Patienten.

Nicht nur die sHLA-E Konzentrationsunterschiede zwischen Männern und Frauen der Tumorgruppe zeigen signifikante Unterschiede. Auch die Dynamik der sHLA-E Konzentration zwischen den männlichen und weiblichen Probanden der Tumor- und der Kontrollgruppe weist Unterschiede auf: Während es bei Frauen keinen signifikanten Unterschied zwischen der sHLA-E Konzentration von Frauen der Tumor- und der Kontrollgruppe gibt (Mann-Whitney-U Test: N=34; U=134; W=353; p=0,916) (Abbildung 10 D), ist die sHLA-E Konzentration bei den männlichen Tumorpatienten signifikant niedriger als bei den männlichen Probanden der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test: N=40; U=312,5; W=565,5; p=0,001) (Abbildung 10 E).

Bei Betrachtung von sHLA-E als immunmodulativer Marker (7) weist diese geschlechterabhängige Dynamik der sHLA-E Konzentration darauf hin, dass der männliche und der weibliche Organismus unterschiedlich auf die Genese von oralen Plattenepithelkarzinomen reagieren. Für orale Plattenepithelkarzinome lassen sich diesbezüglich aktuell keine weiteren wissenschaftlichen Nachweise zitieren. Allerdings können Nachweise für geschlechterspezifische Unterschiede bei anderen Tumorentitäten gezeigt werden: Ahmed et al. konnten, sowohl in der systemischen, als auch in der lokalen immunologischen Antitumorantwort Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Patienten mit Pankreaskarzinom feststellen (3). Im Mausmodell konnten May et al. (72) geschlechterspezifische Unterschiede sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems bei Mäusen mit Lungenkarzinom zeigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern Hinweise darauf, dass es auch bei OSCC einen geschlechterspezifischen Unterschied in der Reaktion des Organismus auf den Tumor geben könnte.

5.7 Mögliche Konsequenzen geschlechterspezifischer Immununterschiede auf die Therapie von OSCC

Einige Studien geben bereits Hinweise darauf, dass Männer und Frauen nicht gleich gut auf die Therapie mit Immuncheckpoint Inhibitoren ansprechen. So scheinen diese, wenn sie als Monotherapie angewendet werden, bei Männern besser zu wirken als bei Frauen. Frauen weisen generell ein aktiveres Immunsystem auf als Männer (107). Dadurch scheinen Therapieansätze, die die Immunantwort lediglich verstärken sollen, bei Frauen weniger effektiv zu sein als bei Männern.

In der vorliegenden Studie liegt bei den männlichen Probanden der Tumorgruppe eine signifikant niedrigere sHLA-E Konzentration vor als bei den weiblichen Probanden. Verglichen mit der Kontrollgruppe weisen die weiblichen Probanden der Tumorgruppe keine signifikante Änderung der sHLA-E Konzentration auf (Mann-Whitney-U Test: N=34; U=134; W=353; p=0,916). Bei den männlichen Studienteilnehmern wurde ein signifikanter Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen Tumor- und Kontrollgruppe festgestellt (Mann-Whitney-U Test: N=40; U=312,5; W=565,5; p=0,001).

Der ausbleibende Unterschied in der sHLA-E Konzentration zwischen der weiblichen Tumor- und Kontrollgruppe gibt einen Hinweis darauf, dass in dieser Kohorte kein Zusammenhang zwischen der sHLA-E Konzentration im Blutserum und der Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome besteht. Möglicherweise sind die Tumorzellen nicht primär an der Freisetzung von sHLA-E beteiligt. Der fehlende Zusammenhang deutet darauf hin, dass die alleinige Betrachtung der sHLA-E Konzentration in der weiblichen Kohorte keine Rückschlüsse für mögliche immuntherapiebetreffende Therapiekonzepte zulässt.

Bei den männlichen Probanden zeigt sich ein anderes Bild: Die sHLA-E Konzentration der Tumorgruppe ist signifikant niedriger als die sHLA-E Konzentration der Kontrollgruppe. Innerhalb der männlichen Kohorte scheint ein Zusammenhang zwischen der Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome und der sHLA-E Konzentration zu bestehen. Dem Interpretationsansatz aus Kapitel 4.3 folgend würde eine niedrigere sHLA-E Konzentration auf eine stärkere Aktivierung der gegen den Tumor gerichteten Immunzellfunktion sprechen. Allerdings muss darauf verwiesen werden, dass die Wirkung von sHLA-E nicht abschließend geklärt ist. In dieser Kohorte scheint folglich das Immunsystem der männlichen Tumorpatienten stärker aktiviert zu sein als das der weiblichen Probanden. Möglicherweise wären in diesem Fall immuntherapeutische Konzepte, die die Wirkung von sHLA-E reduzieren, bei weiblichen Patienten eher indiziert als bei männlichen Patienten.

In der untersuchten Kohorte scheinen die männlichen Probanden zu einer dynamischeren immunologischen Anpassung an den Tumor fähig zu sein als weibliche Probanden. Allerdings wird mit sHLA-E nur ein Faktor betrachtet, was der komplexen Wirkung des Immunsystems nicht gerecht wird und alleine stehend nicht aussagekräftig genug scheint.

Zudem muss bedacht werden, dass die sHLA-E Konzentration im Blutserum sich im pg-Bereich befindet. Inwiefern diese Konzentrationen für eine signifikante Hemmung der Immunzellen ausreichend sind, muss in weiteren Experimenten, evtl. in Zellkulturen, überprüft werden. Zudem muss auf einen konzeptionellen Schwachpunkt der Studie verwiesen werden: Die Serumproben von ca. 20 Kontrollgruppenpatienten wurden 3 bis 4 Wochen vor der Durchführung des ELISAs gesammelt. Alle anderen Proben wurden in einem Zeitraum von ca. 2 Jahren gesammelt. Trotz sachgemäßer Lagerung muss ein möglicher Einfluss des Lagerzeitraums auf die sHLA-E Konzentration in den Proben bedacht werden.

Zusammenfassend scheint die alleinige Betrachtung der sHLA-E Konzentration alleine ungenügend, um Empfehlungen bezüglich des Immuntherapieregimes treffen zu können. Sie gibt allerdings einen Hinweis darauf, dass sich die Immunantwort von Männern und Frauen bei der Genese von OSCC unterscheidet. Dieser Fakt sollte in weiteren Forschungsprojekten berücksichtigt werden. Bei einer verbesserten Datenlage sollte eine entsprechende Anpassung der Therapieregime erfolgen.

6 Literatur

1. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 2018; 9:1869. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01869/full>.
2. Agnihotri V, Gupta A, Kumar L, Dey S. Serum sHLA-G: Significant diagnostic biomarker with respect to therapy and immunosuppressive mediators in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Scientific reports* 2020; 10(1):3806. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32123232/>.
3. Ahmed A, Köhler S, Klotz R, Giese N, Hackert T, Springfield C et al. Sex Differences in the Systemic and Local Immune Response of Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* 2023; 15(6). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10047039/>.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Hrsg. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition: Garland Science; 2002.
5. Albitar M, Vose JM, Johnson MM, Do K-A, Day A, Jilani I et al. Clinical relevance of soluble HLA-I and beta2-microglobulin levels in non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Leukemia research* 2007; 31(2):139–45. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16545870/>.
6. Alhaji M, Farhana A, Hrsg. *StatPearls* [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
7. Allard M, Oger R, Vignard V, Percier J-M, Fregni G, Périer A et al. Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer. *PLoS ONE* 2011; 6(6):e21118. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119680/>.
8. Altwater B, Kailayangiri S, Pérez Lanuza LF, Urban K, Greune L, Flügge M et al. HLA-G and HLA-E Immune Checkpoints Are Widely Expressed in Ewing Sarcoma but Have Limited Functional Impact on the Effector Functions of Antigen-Specific CAR T Cells. *Cancers* 2021; 13(12):2857. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/12/2857>.
9. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 2010; 363(1):24–35. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20530316/>.
10. Babay W, Ben Yahia H, Boujelbene N, Zidi N, Laaribi AB, Kacem D et al. Clinicopathologic significance of HLA-G and HLA-E molecules in Tunisian patients with ovarian carcinoma. *Human immunology* 2018; 79(6):463–70. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499226/>.
11. Bangia N, Ferrone S. Antigen presentation machinery (APM) modulation and soluble HLA molecules in the tumor microenvironment: do they provide tumor cells with escape mechanisms from recognition by cytotoxic T lymphocytes? *Immunological Investigations* 2006; 35(3-4):485–503. doi: 10.1080/08820130600808246.
12. Baysal H, Siozopoulou V, Zaryouh H, Hermans C, Lau HW, Lambrechts H et al. The prognostic impact of the immune signature in head and neck squamous cell carcinoma. *Front. Immunol.* 2022; 13:1001161. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36268020/>.
13. Belizário JE, Neyra JM, Setúbal Destro Rodrigues MF. When and how NK cell-induced programmed cell death benefits immunological protection against intracellular pathogen infection. *Innate Immunity* 2018; 24(8):452–65. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6830868/>.
14. Benevolo M, Mottolese M, Tremante E, Rollo F, Diodoro MG, Ercolani C et al. High expression of HLA-E in colorectal carcinoma is associated with a favorable prognosis. *Journal of Translational Medicine* 2011; 9:184. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219584/>.

15. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(2):197–250. doi: 10.1177/10454411930040020401.
16. Blasco MA, Svider PF, Raza SN, Jacobs JR, Folbe AJ, Saraf P et al. Systemic therapy for head and neck squamous cell carcinoma: Historical perspectives and recent breakthroughs. *The Laryngoscope* 2017; 127(11):2565–9. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lary.26629>.
17. Boegel S, Löwer M, Bukur T, Sorn P, Castle JC, Sahin U. HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics* 2018; 11(1):36. Verfügbar unter: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-018-0354-x>.
18. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisie CL, Jotereau F et al. HLA-E/ β 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *International journal of cancer* 2012; 131(4):855–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21953582/>.
19. Botticelli A, Onesti CE, Zizzari I, Cerbelli B, Sciattella P, Occhipinti M et al. The sexist behaviour of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy? *Oncotarget* 2017; 8(59):99336–46. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29245905/>.
20. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391(6669):795–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486650/>.
21. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, Castro G de et al. 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. *The Lancet* 2019; 394(10212):1915–28. Verfügbar unter: [https://www.thelancet.com/article/S0140-6736\(19\)32591-7/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S0140-6736(19)32591-7/fulltext).
22. Camilli G, Cassotta A, Battella S, Palmieri G, Santoni A, Paladini F et al. Regulation and trafficking of the HLA-E molecules during monocyte-macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology* 2016; 99(1):121–30. Verfügbar unter: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.1A0415-172R>.
23. Campoli M, Ferrone S. Tumor escape mechanisms: potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands. *Tissue Antigens* 2008; 72(4):321–34. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0039.2008.01106.x>.
24. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal* 2007; 48(1):11–23. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2628004/>.
25. Cognetti DM, Weber RS, Lai SY. Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 2008; 113(7 Suppl):1911–32. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751600/>.
26. Conforti F, Pala L, Bagnardi V, Pas T de, Martinetti M, Viale G et al. Cancer immunotherapy efficacy and patients' sex: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Oncology* 2018; 19(6):737–46. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29778737/>.
27. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *J Immunol* 1942; 45(3):159–70. Verfügbar unter: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/45/3/159/63211/The-Demonstration-of-Pneumococcal-Antigen-in>.

28. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Soulillou J-P, Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 2007; 109(7):2806–14. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17179229/>.
29. Dakup PP, Greer AJ, Gaddameedhi S. Let's talk about sex: A biological variable in immune response against melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2022; 35(2):268–79. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9305920/>.
30. Decker T, Kovarik P, Meinke A. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 1997; 17(3):121–34. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9085936/>.
31. Derré L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2006; 177(5):3100–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16920947/>.
32. Dhouioui S, Boujelbene N, Chelbi H, Zemni I, Ben Safta I, Ouzari H-I et al. sHLA-G as a biomarker for colorectal cancer pathogenesis. *Journal of King Saud University - Science* 2022; 34(1):101708. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364721003700>.
33. Dudek NL, Purcell AW. Repertoire of Nonclassical MHC I (HLA-E, HLA-F, HLA-G, and Orthologues). In: Ratcliffe MJ, Hrsg. *Encyclopedia of Immunobiology*. 3rd ed. Saint Louis: Elsevier Science; 2016. S. 215–9 Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123742797060069>.
34. Epling-Burnette PK, Wei S, Djeu JY. Chapter Seven - Signalling events in natural killer cells. In: Lotze MT, Thomson AW, Hrsg. *Natural killer cells: Basic science and clinical application*. Amsterdam, Boston, London: Elsevier/Academic Press; 2010. S. 95–112 Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123704542000077>.
35. Farjadian S, Tabebordbar M, Mokhtari M, Safaei A, Malekzadeh M, Ghaderi A. HLA-G Expression in Tumor Tissues and Soluble HLA-G Plasma Levels in Patients with Gastrointestinal Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 2018; 19(10):2731–5. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6291033/>.
36. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol* 2010; 21(10):1961–6. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419395882>.
37. Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Sci Rep* 2018; 8(1):2732. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-21048-y>.
38. Goel R, Kabeerdoss J, Mohan H, Danda S, Jayaseelan V, Kumar TS et al. Soluble-HLA-E: A follow up biomarker in Takayasu arteritis, independent of HLA-E genotype. *International journal of rheumatic diseases* 2018; 21(2):532–40. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28425192/>.
39. Gold SM, Sasidhar MV, Morales LB, Du S, Sicotte NL, Tiwari-Woodruff SK et al. Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ERalpha). *Lab Invest* 2009; 89(10):1076–83. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/labinvest200979>.
40. Gooden M, Lampen M, Jordanova ES, Leffers N, Trimpos JB, van der Burg SH et al. HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011; 108(26):10656–61. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670276/>.
41. Grant EJ, Nguyen AT, Lobos CA, Szeto C, Chatzileontiadou DSM, Gras S. The unconventional role of HLA-E: The road less traveled. *Molecular immunology* 2020; 120:101–12. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32113130/>.
 42. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK et al. Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 2003; 97(6):1464–70. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12627511/>.
 43. Hanak L, Slaby O, Lauerova L, Kren L, Nenutil R, Michalek J. Expression pattern of HLA class I antigens in renal cell carcinoma and primary cell line cultures: methodological implications for immunotherapy. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2009; 15(12):CR638-43. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19946235/>.
 44. Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *International immunopharmacology* 2007; 7(13):1765–75. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17996687/>.
 45. HAWES D, SHI S-R, DABBS DJ, TAYLOR CR, COTE RJ. *Immunohistochemistry. Modern Surgical Pathology* 2009:48–70. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151845/>.
 46. Helliwell TR. Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *J. Pathol.* 2001; 194(3):289–93. Verfügbar unter: [https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-9896\(200107\)194:3%3C289::AID-PATH912%3E3.0.CO;2-L](https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-9896(200107)194:3%3C289::AID-PATH912%3E3.0.CO;2-L).
 47. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet* 2016; 387(10027):1540–50. Verfügbar unter: [https://www.thelancet.com/article/S0140-6736\(15\)01281-7/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S0140-6736(15)01281-7/fulltext).
 48. Hnasko TS, Hnasko RM. *The Western Blot. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2015; 1318:87–96. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26160567/>.
 49. Hoffmann TK, Schuler PJ, Laban S, Grässlin R, Beer M, Beer AJ et al. Response Evaluation in Head and Neck Oncology: Definition and Prediction. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 2017; 79(1-2):14–23. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231577/>.
 50. Hou J, Zheng WF. Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *International journal of immunopharmacology* 1988; 10(1):15–22. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3366506/>.
 51. IARC Monographs List of Classifications by Cancer Sites with Sufficient or Limited Evidence in Humans. [Stand: 15.11.2023]. Verfügbar unter: https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classifications_by_cancer_site.pdf.
 52. Ishigami S, Arigami T, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H et al. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. *Anticancer research* 2015; 35(4):2279–85. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862890/>.
 53. Jawhar NMT. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine* 2009; 29(2):123–7. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2813639/>.

54. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 2018; 118(1):9–16. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/bjc2017434>.
55. Kessler AL, Bruno MJ, Buschow SI. The Potential of Soluble Human Leukocyte Antigen Molecules for Early Cancer Detection and Therapeutic Vaccine Design. *Vaccines* 2020; 8(4). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7766713/#B50-vaccines-08-00775>.
56. Kessler AL, Bruno MJ, Buschow SI. The Potential of Soluble Human Leukocyte Antigen Molecules for Early Cancer Detection and Therapeutic Vaccine Design. *Vaccines* 2020; 8(4). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7766713/>.
57. Kirana C, Ruszkiewicz A, Stubbs RS, Hardingham JE, Hewett PJ, Maddern GJ et al. Soluble HLA-G is a differential prognostic marker in sequential colorectal cancer disease stages. *International journal of cancer* 2017; 140(11):2577–86. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28233298/>.
58. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(10):626–38. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.90>.
59. Lai L-T, Gu W-G, Hu M-B, Wang W-J, Wang S-S, Huai Y-J et al. Sex-related differences in the efficacy of immune checkpoint inhibitors in malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)* 2021; 13(11):15413–32. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8221333/>.
60. Lee J, Keam B, Park H-R, Park J-E, Kim S, Kim M et al. Monalizumab efficacy correlates with HLA-E surface expression and NK cell activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023; 149(9):5705–15. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-022-04532-x>.
61. Li M, Xue F, Yang J, Pan X. Correlation between tumor marker CA72-4 and prognosis of patients with gastric cancer: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2020; 99(52):e23723. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7769321/>.
62. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(8):594–604. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nri2815>.
63. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(21):12150–5. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11572934/>.
64. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 2001; 92(4):805–13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11550151/>.
65. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 1990; 11(7):237–44. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2201309/>.
66. Löffek S, Schilling O, Franzke C-W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* 2011; 38(1):191–208. Verfügbar unter: <https://erj.ersjournals.com/content/38/1/191>.
67. Lubov J, Labbé M, Sioufi K, Morand GB, Hier MP, Khanna M et al. Prognostic factors of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2021; 50(1):54. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8425113/>.

68. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2019; 1897:289–98. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749998/>.
69. Mäkitie AA, Agaimy A, Almangush A. Insight into Classification and Risk Stratification of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Era of Emerging Biomarkers with Focus on Histopathologic Parameters. *Cancers* 2022; 14(22):5514. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/22/5514>.
70. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22(2):17–31. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453798/>.
71. Mandy Alhadj, Aisha Farhana. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: Alhadj M, Farhana A, Hrsg. *StatPearls* [Internet]: StatPearls Publishing; 2022 Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.
72. May LA, Landry JW, Martin R, Li HY, Koblinski J, Bos PD. Abstract 670: Sex differences in the innate immune response to lung cancer. *Cancer Res* 2023; 83(7_Supplement):670. doi: 10.1158/1538-7445.AM2023-670.
73. Morandi F, Cangemi G, Barco S, Amoroso L, Giuliano M, Gigliotti AR et al. Plasma levels of soluble HLA-E and HLA-F at diagnosis may predict overall survival of neuroblastoma patients. *BioMed research international* 2013; 2013:956878. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24350297/>.
74. Morandi F, Pozzi S, Carlini B, Amoroso L, Pistoia V, Corrias MV. Soluble HLA-G and HLA-E Levels in Bone Marrow Plasma Samples Are Related to Disease Stage in Neuroblastoma Patients. *Journal of immunology research* 2016; 2016:7465741. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004009/>.
75. Morinaga T, Iwatsuki M, Yamashita K, Yasuda-Yoshihara N, Yamane T, Matsumoto C et al. Dynamic Alteration in HLA-E Expression and Soluble HLA-E via Interaction with Natural Killer Cells in Gastric Cancer. *Annals of surgical oncology* 2023; 30(2):1240–52. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36149610/>.
76. Moyses RA, López RVM, Cury PM, Siqueira SAC, Curioni OA, Gois Filho JF de et al. Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck cancer patients. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 2013; 68(6):738–44. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23778492/>.
77. MSD SHARP & DOHME GMBH. Pembrolizumab (Keytruda) Zulassungserweiterung HNSCC. Vidal MMI Germany GmbH 25.09.2018 [Stand: 04.01.2024]. Verfügbar unter: <https://www.gelbe-liste.de/onkologie/pembrolizumab-keytruda-zulassungserweiterung-hnsc>.
78. Murphy K, Weaver C. Die T-Zell-vermittelte Immunität. *Janeway Immunologie*:443–515. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7844875/>.
79. National library of medicine. HLA-E major histocompatibility complex, class I, E; 2022 [Stand: 13.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=3133>.
80. Natoli AK, Medley TL, Ahimastos AA, Drew BG, Thearle DJ, Dilley RJ et al. Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2005; 46(5):1129–34. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16230520/>.
81. Nauta IH, Heideman DAM, Brink A, van der Steen B, Bloemena E, Koljenović S et al. The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma. *International*

- journal of cancer 2021; 149(2):420–30. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8251537/>.
82. Nilsson UW, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 2007; 102(3):253–61. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17031577/>.
 83. Pan S, Guan J, Xianyu B, Tan Y, Li T, Xu H. A Nanotherapeutic Strategy to Reverse NK Cell Exhaustion. *Advanced Materials* 2023; 35(23):e2211370. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.202211370>.
 84. Pietra G, Romagnani C, Moretta L, Mingari MC. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells. *Current pharmaceutical design* 2009; 15(28):3336–44. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19860683/>.
 85. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in cancer biology* 2007; 17(6):469–79. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2200630/>.
 86. Ren X, Wang J, Lin X, Wang X. E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations. *Oncotargets and therapy* 2016; 9:2447–53. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853145/>.
 87. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1995; 376(6):345–55. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7576228/>.
 88. Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. *Br J Cancer* 2009; 100(8):1219–29. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676559/>.
 89. Rivera F, García-Castaño A, Vega N, Vega-Villegas ME, Gutiérrez-Sanz L. Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial. *Expert review of anticancer therapy* 2009; 9(10):1421–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19828002/>.
 90. Rizzo R, Trentini A, Bortolotti D, Manfrinato MC, Rotola A, Castellazzi M et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. *Molecular and cellular biochemistry* 2013; 381(1-2):243–55. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23737137/>.
 91. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [Stand: 06.07.2022]. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-100OLI_S3-Diagnostik-Therapie-Mundhoehlenkarzinom_2021-03.pdf.
 92. Seliger B. Immune-escape-Mechanismen und Resistenzen gegenüber Immuntherapien. *TumorDiagn u Ther* 2019; 40(02):94–7. doi: 10.1055/a-0802-3951.
 93. Seliger B, Jasinski-Bergner S, Quandt D, Stoehr C, Bukur J, Wach S et al. HLA-E expression and its clinical relevance in human renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(41):67360–72. Verfügbar unter: <https://www.oncotarget.com/article/11744/text/>.
 94. Shan D, Cheng S, Ma Y, Peng H. 上皮性卵巢癌血清中肿瘤标志物水平及其临床意义 (英文) . *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences* 2023; 48(7):1039–49. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37724407/>.
 95. Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X, Fleming SD. Humoral innate immune response and disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2012; 144(2):142–58. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771788/>.

96. Shwetank, Date OS, Carbone E, Manjunath R. Inhibition of ERK and proliferation in NK cell lines by soluble HLA-E released from Japanese encephalitis virus infected cells. *Immunology Letters* 2014; 162(1 Pt A):94–100. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247814001503>.
97. Shwetank, Date OS, Kim KS, Manjunath R. Infection of human endothelial cells by Japanese encephalitis virus: increased expression and release of soluble HLA-E. *PLOS ONE* 2013; 8(11):e79197. Verfügbar unter: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079197>.
98. Silva TG, Crispim JCO, Miranda FA, Hassumi MK, Mello JMY de, Simões RT et al. Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness. *Histology and histopathology* 2011; 26(12):1487–97. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21972088/>.
99. Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJRC, Meeuwis CA, Marres HAM, Knegt PPM et al. Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128(5):512–8. Verfügbar unter: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/fullarticle/482869>.
100. The innate and adaptive immune systems. In: *InformedHealth.org* [Internet]: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2020 [Stand: 14.12.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>.
101. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 2016; 16(5):275–87. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5381938/>.
102. Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372(1732). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597737/>.
103. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *The AAPS Journal* 2021; 23(2):39. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7937597/>.
104. Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Lösliche Serumfaktoren als prognostische Marker des Melanoms: sHLA, sFas und IL-8. *Akt Dermatol* 2002; 28(8/9):302–9. doi: 10.1055/s-2002-33965.
105. updated by Eri Kinoshita (David Kitz Kramer). *Immunhistochemie (IHC)*; 2013 [Stand: 03.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1216/immunhistochemie-ihc/>.
106. Wallis CJD, Butaney M, Satkunasivam R, Freedland SJ, Patel SP, Hamid O et al. Association of Patient Sex With Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors and Overall Survival in Advanced Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA oncology* 2019; 5(4):529–36. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30605213/>.
107. Wang S, Cowley L an, Liu X-S. Sex Differences in Cancer Immunotherapy Efficacy, Biomarkers, and Therapeutic Strategy. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2019; 24(18). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31487832/>.
108. Wang Y, Yang T, Gan C, Wang K, Sun B, Wang M et al. Temporal and spatial patterns of recurrence in oral squamous cell carcinoma, a single-center retrospective cohort study in China. *BMC Oral Health* 2023; 23(1):679. Verfügbar unter: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-023-03204-7>.

109. Xu Y-F, Du X-F, Li Z-Y, Fang Z-P, Zhang F-B. Lesion human leukocyte antigen-E is associated with favourable prognosis for patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *J Int Med Res* 2021; 49(10):3000605211047278. doi: 10.1177/03000605211047278.
110. Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland - Mundhöhle und Rachen [Stand: 31.03.2022]. Verfügbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c00_c14_mundhoehle_rachen.pdf?__blob=publicationFile.
111. Zhen Z-J, Ling J-Y, Cai Y, Luo W-B, He Y-J. Impact of HLA-E gene polymorphism on HLA-E expression in tumor cells and prognosis in patients with stage III colorectal cancer. *Medical oncology* (Northwood, London, England) 2013; 30(1):482. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23377987/>.

7 Tabellarischer Anhang

Tabelle 15: Verbrauchsmaterial

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger, Art.-Nr. 1110022A	Engelbrecht, Edermünde
Mikrotom-Klinge	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Supa Mega Cassette-White	Engelbrecht, Edermünde
RL-Pen	R. Langenbring, Emmendingen
Laborpapier	Kimberly-Clark Europe Limited/Professional Sector, Reigate, UK
Einbettkassetten universal	Engelbrecht, Edermünde
Eppendorfgefäße	Eppendorf SE, Hamburg Germany
MultiGuard Barrier Tips, Pipettenspitzen 1000 µl	Sorenson™, BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Greiner bio-one filter tips	Greiner Group AG, Kremsmünster, Austria
Einwegtransferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Liquid Blocker	Daido Sangyo Co., Ltd., Japan
Handschuhe	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Spritzflasche 250 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany
Kryoröhrchen 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Octenisept 250 ml	Schüle & Mayr, Norderstedt, Germany
Butterflies	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Monovetten 4,7 ml (Serum)	Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Tabelle 16: Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
Entellan© new (Schnelleindeckmittel)	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde
Histogel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Xylol	VWR International, Radnor, PA, USA
Ethanol	VWR International, Radnor, PA, USA
Eukitt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Citrat Buffer	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Large Volume Tween 20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 17: Geräte

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
Stanzgerät	AlphaMetrixBiotech GmbH, Rodgau
Wärmeschrank U 10	Memmert, Schwabach
Kühlplatte	Weinkauf Medizintechnik, Hallerndorf
Tissue-Tek® TEC™ 6 Embedding Module	Sakura, Nagano, Japan
Tissue-Tek® TEC™ 6 Cryo Module	Sakura, Nagano, Japan
Tissue-Tek® VIP®	Sakura, Nagano, Japan
Paraffinstreckbad	Medax,
Mikroskop Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, Japan
Linear Stainer COT 20	Medite Medical GmbH, Burgdorf
Leica CV5030 automatischer Glaseindeckautomat	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mini Shaker 3D	BioSan, Riga, Lettland
Dampfgarer	Philipps
Kühlplatte Blue Cooler	Weinkauf Medizintechnik, Hallerndorf
Mikrotom Rotary 3004 M	pfm medical GmbH, Köln, Germany
Wasserbad	Medamex Nagel GmbH, Kiel, Germany
Wärmeschrank 60 °C	Memmert, Schwabach, Germany
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg Germany
Transferpipette-12 202-200 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany
Stain Tray Objektträger Färbesystem	Simport Scientific Inc., Quebec, Canada
Vortex Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Titramax 100 ELISA-Rüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Germany
IMark™ Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Mr. Frosty	Nalgene, Rochester, NY, USA
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Zentrifuge Z 383 K	Berthold Hermle AG, Gosheim, Germany
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Germany
Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Germany
HeraFreeze Basic Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 18: Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezies</i>	<i>Clone/Firma</i>
Anti-HLA E Antikörper	Maus	[MEM-E/02] (ab2216), Abcam, Cambridge, UK
ImmPRESS Universal Antibody	Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Tabelle 19: Kits

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>
HLA-E ELISA Kit (Catalog No. ABIN6956585)	antibodies-online GmbH, Limerick, PA, United States
BLOXALL Endogenous Enzyme Blocking	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
2,5%iges Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
ImmPACT DAB EqV Substrate	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Tabelle 20: IHC-Puffer und Lösungen

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
10 x Citratpufferlösung, pH 6	10-fach mit destillierten Wasser verdünnen
10 x Phosphate-Buffered Saline	950 mg/L Na ₃ HPO ₄ , 8120 mg/L NaCl, 201 mg/L KCl; pH 7,45
PBS-T	100 ml PBS x 10, 900 ml destilliertes Wasser, 1 ml Tween 20

Tabelle 21: Software

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
Citavi 6	Swiss Academic Software, Schweiz
IBM SPSS Statistics 27	IBM, Armonk NY, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Albuquerque, US
Zen 3.8 lite	Carl Zeiss GmbH, Jena
GraphPad Prism Version 9.1.5	GraphPad Software, Inc., Boston, Ma, USA
Microplate Manager® 6, Version 6.3	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Acrobat Reader Basisversion 23.2048	Adobe Inc., San José, CA, USA

8 Eigene Veröffentlichungen

Anne Radermacher, Michael Fehrenz, Tamara Bellin, Carolina Claßen, Laura Möller, Ann-Kristin Struckmeier, Mathias Wagner, Philipp Wartenberg, Julius Moratin, Christian Freudlsperger, Kolja Freier, Dominik Horn: **HLA-E and its Soluble Form as Indicators of a Sex-Specific Immune Response in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma**, Int. J. Mol. Sci. 2023 Nov 24, 16699; doi.org/10.3390/ijms242316699

Ann-Kristin Struckmeier, **Anne Radermacher**, Michael Fehrenz, Dalia Alansary, Philipp Wartenberg, Mathias Wagner, Anja Scheller, Jochen Hess, Julius Moratin, Christian Freudlsperger, Jürgen Hoffmann, Lorenz Thurner, Klaus Roemer, Kolja Freier, Dominik Horn: **TREM2 Is Associated with Advanced Stages and Inferior Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma**, Cancers (Basel), 2022 Sep 24;14(19):4635. doi: 10.3390/cancers14194635

Ann-Kristin Struckmeier, **Anne Radermacher**, Michael Fehrenz, Tamara Bellin, Dalia Alansary, Philipp Wartenberg, Ulrich Boehm, Mathias Wagner, Anja Scheller, Jochen Hess, Julius Moratin, Christian Freudlsperger, Jürgen Hoffmann, Lorenz Thurner, Klaus Roemer, Kolja Freier, Dominik Horn: **IDO1 is highly expressed in macrophages of patients in advanced tumour stages of oral squamous cell carcinoma**, J Cancer Res Clin Oncol 2023 Jul;149(7):3623-3635. doi: 10.1007/s00432-022-04277-7 . Epub 2022 Aug 13.

9 Danksagung

Ich möchte meinem Chef und Doktorvater, Herrn Univ-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier, für seine Geduld, die konstruktiven Gespräche und die Freiheit, diese Arbeit mit eigenen Ideen gestalten zu können, danken.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Dominik Horn aussprechen, der mich als Betreuer meiner Dissertation an wissenschaftliche Arbeitspraktiken herangeführt, immer motiviert und durch viele hilfreiche Anmerkungen unterstützt hat.

Prof. Dr. Ulrich Boehm aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes danke ich für die Möglichkeit, unsere Objektträger einscannen zu dürfen.

Ich danke außerdem Janine Laubscher, die mich mit viel Witz, fachlicher Expertise, einem freundlichen Lachen und einem offenen Ohr durch einige lange Arbeitsnachmittage in der Pathologie gebracht und mir viel zusätzliche Arbeit erspart hat.

Laura Möller möchte ich für die Unterstützung im Labor und bei der Probenverarbeitung, selbst zu späten Tageszeiten, danken.

Ich danke auch meiner Familie, insbesondere meinem Bruder Sebastian und meinem Vater Heinz-Ludwig, für ihr mehrfaches Korrekturlesen. Philipp danke ich für seine Hilfe bei der Ausarbeitung der Statistik, seine Geduld und seinem Verständnis für gelegentliches Arbeiten am Wochenende.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.