

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

**Einfluss von Vitamin-D auf die Zusammensetzung regulatorischer
Populationen tumorinfiltrierender Leukozyten und deren Effektormoleküle
bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2024

vorgelegt von: Franziska Karoline Sterkel
geb. am 17.12.1996 in Iserlohn

Tag der Promotion: 25.03.2025

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Maximilian Linxweiler

Prof. Markus Hoth

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 5 |
| 2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs | 5 |
| 2.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Ätiologie | 5 |
| 2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose | 7 |
| 2.2 Das humane Immunsystem | 10 |
| 2.2.1 Humorale Komponenten | 11 |
| 2.2.2 Zelluläre Komponenten | 13 |
| 2.2.3 Lymphozyten und ihre Moleküle | 17 |
| 2.2.3.1 CD20 | 17 |
| 2.2.3.2 CTLA4 | 18 |
| 2.2.3.3 FasL | 19 |
| 2.2.3.4 FoxP3 | 20 |
| 2.2.3.5 IL10 | 20 |
| 2.3 Vitamin-D und das Immunsystem | 22 |
| 2.4 Vitamin-D | 23 |
| 2.4.1 Physiologie des Vitamin-D | 23 |
| 2.4.2 Funktion des Vitamin-D | 24 |
| 2.4.3 Bestimmung des Vitamin-D-Status | 24 |
| 2.4.4 Vitamin-D-Mangel, Dosierung und Intoxikation | 25 |
| 2.4.5 Vitamin-D und sein Einfluss auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem | 26 |
| 2.5 Zielsetzung der Arbeit | 31 |
| 3. Material und Methoden | 33 |
| 3.1 Materialien und Herstellernachweis | 33 |
| 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien | 33 |
| 3.1.2 Chemikalien | 34 |
| 3.1.3 Lösungen und Puffer | 34 |
| 3.1.4 Primärantikörper | 35 |
| 3.2 Immunhistochemische Analysen | 35 |
| 3.2.1 Funktionsprinzip der Immunhistochemie (IHC) | 35 |
| 3.2.2 Fixierung des Gewebes | 36 |
| 3.2.3 Etablierungen der immunhistochemischen Färbeprotokolle | 37 |
| 3.2.4 Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen | 39 |
| 3.3 Analytische Methoden | 41 |
| 3.3.1 Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie | 41 |
| 3.3.2 Statistische Analysen | 42 |
| 3.3.3 TNM-Klassifikation und Tumordifferenzierung | 42 |
| 3.3.4 Anonymisiertes Patientenkollektiv | 43 |
| 3.3.4.1 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (n=63) | 44 |

| | | |
|---------|--|-------|
| 3.3.4.2 | Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (n=53)..... | 46 |
| 4. | Ergebnisse | 48 |
| 4.1 | Beschreibung des Patientenkollektivs | 48 |
| 4.2 | Charakterisierung der mikroskopischen Präparate | 50 |
| 4.2.1 | Präparatgröße, Tumor- und Stromaanteil, Leukozytenzahl, Leukozyteninfiltration..... | 50 |
| 4.2.2 | Auswertung der T- und N-Stadien | 52 |
| 4.3 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen | 53 |
| 4.3.1 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD20 an HNSCCs | 55 |
| 4.3.2 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CTLA4 an HNSCCs | 57 |
| 4.3.3 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von FasL an HNSCCs | 59 |
| 4.3.4 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von FoxP3 an HNSCCs | 63 |
| 4.3.5 | Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von IL10 an HNSCCs | 65 |
| 4.4 | Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen..... | 68 |
| 4.5 | Überlebensanalysen..... | 68 |
| 4.5.1 | Überlebensanalyse abhängig vom Vitamin-D-Status..... | 68 |
| 4.5.2 | Überlebensanalysen abhängig von den immunhistochemisch analysierten Leukozyten-Markern..... | 69 |
| 5. | Diskussion..... | 73 |
| 5.1 | Stellenwert von Vitamin-D und der immunmodulatorischen Therapiekonzepte in der Kopf-Hals-Onkologie | 73 |
| 5.2 | Einfluss von Vitamin-D auf die Expression leukozytärer Effektormoleküle bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs | 80 |
| 6. | Literaturverzeichnis | I |
| 7. | Abbildungsverzeichnis..... | XII |
| 8. | Tabellenverzeichnis..... | XVI |
| 9. | Publikationen..... | XVI |
| 10. | Danksagung | XVI |
| 11. | Lebenslauf..... | XVIII |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|--|
| 1,25 (OH) D ₂ | Calcitriol |
| % | Prozent |
| ° C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| APP | Akute-Phase-Proteine |
| BCR | B-Zell-Rezeptor |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| bzw. | beziehungsweise |
| bzgl. | bezüglich |
| ca. | circa |
| CD | cluster of differentiation |
| CED | chronisch entzündliche Darmerkrankung |
| cm | Zentimeter |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CT | Computertomographie |
| CTLA4 | cytotoxic T-Lymphocyte associated antigen 4 |
| DBP | Vitamin-D-bindendes Protein |
| DC | dendritische Zellen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ED | Erstdiagnose |
| EDTA | Tetraethylendiaminoessigsäure |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| et al. | und andere |
| m/sFasL | membrangebundene/lösliche (soluble) Form Fas-Ligand |
| FFPE | Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe |
| FoxP3 | forkhead box P3 |
| g | Gramm |
| Gew.-% | Gewichtsprozent |
| ggf. | gegebenenfalls |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HCL | Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin/Eosin |
| HNO | Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde |
| HNSCC | Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma) |
| HPV | Humaner Papillomvirus/Humane Papillomviren |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |

| | |
|---------------------|---|
| i/nT ^{REG} | induzierte/natürliche regulatorische T-Zellen |
| l | Liter |
| mg, mm, ml | Milligramm, Millimeter, Milliliter |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| mM, M | Milli-, Molarität (entspricht der molaren Masse in einem Liter) |
| min | Minute |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| µg, µm, µl | Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter |
| n | Stichprobenumfang |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| ng, nm | Nanogramm, Nanometer |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| o.g. | oben genannt |
| p | statistischer Signifikanzwert |
| PBS | phosphatgepufferte Standardsalzlösung |
| pH | negative dekadische Logarithmen der Wasserstoffionenkonzentration |
| PTH | Parathormon |
| s/sec | Sekunde |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TH-Zellen | T-Helferzellen |
| TIL | tumorinfiltrierende Lymphozyten |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TR1 | Type 1 regulatory T-cells |
| u.a. | unter anderem |
| UV | ultraviolettes Licht |
| VDM | Patientenkollektiv mit Vitamin-D-Mangel |
| VDA | Patientenkollektiv mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung |
| VDR | Vitamin-D-Rezeptor |
| VDRE | Vitamin-D-Response-Element |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| w/v | weight/volume, Gewichtsprozent |
| 18F-FDG-PET-CT | 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography |

1. Zusammenfassung

Als sechst häufigste Tumorentität weltweit mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von rund 55 % gehören Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs zu den häufigsten Tumoren des Menschen und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Hinzu kommt, dass unter anderem wegen der oft späten Diagnosestellung die Therapiemöglichkeiten trotz der intensiven Forschungsbemühungen der letzten Jahrzehnte nach wie vor begrenzt sind. Die häufig fortgeschrittenen Tumoren generieren zudem ein immunsuppressives Tumormikromilieu was medikamentöse Therapiemöglichkeiten weiter limitiert. All dies impliziert die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze. Mit seiner in der Literatur immer deutlicher belegten antitumoralen und immunstimulierenden Wirkung bietet Vitamin-D hierbei einen vielversprechenden Ansatz. Aus mehreren Studien der vergangenen Jahre geht hervor, dass Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren oft unter einem Vitamin-D-Mangel leiden, der seinerseits wiederum mit schlechteren Prognoseaussichten assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde vor diesem Hintergrund der Einfluss des Vitamin-D-Status von Kopf-Hals-Tumorpatienten auf die antitumorale Immunabwehr durch eine differenzierte Analyse des immunologischen Tumormikromilieus untersucht.

Hierfür wurden Gewebeproben von 116 Kopf-Hals-Tumorpatienten immunhistochemisch gefärbt, das Expressionsverhalten von fünf Zielproteinen analysiert und mit dem Vitamin-D-Serumspiegel der Patienten korreliert. Im Einzelnen wurden dabei CD20, CTLA4, FasL, FoxP3 und IL10 untersucht. Ein Vitamin-D-Mangelzustand wurde definiert ab einem 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml, was auf 63 Patienten zutraf, während 53 Patienten einen Spiegel über 25 ng/ml aufwiesen und somit zu den ausreichend mit Vitamin-D versorgten Patienten des Kollektivs gezählt wurden. Im Anschluss erfolgte die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit Hilfe eines immunreaktiven Scores, der für zwei der fünf Zielproteine modifiziert und für weitere zwei Zielproteine erweitert wurde, um eine optimale Auswertung zu gewährleisten. Dabei wurde für alle Marker das intratumorale und das peritumorale immunologische Tumormikromilieu getrennt ausgewertet.

Die immunhistochemischen Analysen zeigten dabei am eindrucklichsten bei CD20 eine positive Korrelation zwischen einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und einer vermehrten Infiltration CD20 exprimierender Zellen (B-Lymphozyten). Die tumorale Infiltration mit B-Lymphozyten zeigte sich bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung statistisch signifikant gesteigert ($p=0,0289$), während im peritumoralen Gewebe von einer deutlichen Tendenz hin zu einer vermehrten Infiltration gesprochen werden kann ($p=0,0662$). Die statistische Analyse von CTLA4, FasL, FoxP3 und IL10 ergab keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Vitamin-D-Serumspiegel der Patienten. Allerdings zeigte das Ausmaß

1. Zusammenfassung

der Infiltration des Tumormikromilieus mit den durch die genannten Marker untersuchten Immunzellpopulationen einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. Insbesondere die erhöhte intratumorale Infiltration CD20 exprimierender Zellen sowie peritumorale Infiltration CTLA4 exprimierender Zellen korrelierte statistisch signifikant mit einem verlängertem Gesamtüberleben ($p=0,0401$ und $p=0,0398$). Auch die gesteigerte peritumorale Infiltration CD20 exprimierender Zellen und intratumorale Infiltration CTLA4 exprimierender Zellen zeigte eine deutliche Tendenz hin zu einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten ($p=0,1394$ und $p=0,0604$). FoxP3 als Surrogatmarker für regulatorische T-Zellen zeigte eine geringe, nicht-signifikante Tendenz zu einem verlängerten Gesamtüberleben bei einer hohen peri- und intratumoralen Infiltration der exprimierenden Zellen ($p=0,3421$ und $p=0,5964$). Keinen signifikanten Überlebensvorteil ergab eine gesteigerte Infiltration von FasL und IL10 exprimierender Leukozyten. Insgesamt wiesen Patienten des untersuchten Kollektivs mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung unabhängig von den zuvor dargestellten Markern ein statistisch signifikant verlängertes Gesamtüberleben auf verglichen mit Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ($p=0,0233$).

Zusammenfassend demonstrieren die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse, dass ein ausreichender Vitamin-D-Serumspiegel bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs immenser Bedeutung für die Prognose- und Therapieaussichten ist. Der Einfluss von Vitamin-D auf die Immuninfiltration des Tumormikromilieus und die Effektormoleküle einzelner Leukozyten-Subpopulationen wurde in dieser Arbeit deutlich und deutet eine stimulierende Wirkung auf die antitumorale Aktivität des Immunsystems bei Kopf-Hals-Karzinompatienten an. Perspektivisch sind weitere molekulargenetische Untersuchungen notwendig, um zusätzliche immunmodulatorische Wirkungsweisen und das antitumorale Potential von Vitamin-D zu entschlüsseln. Neben der leitliniengerechten und aktuell etablierten multimodalen Therapie von Kopf-Hals-Tumoren, könnte die kostengünstige Substitution von Vitamin-D zu einer Steigerung der Effektivität der bisherigen Therapieansätze, insbesondere der bereits klinisch etablierten Immuntherapie durch Checkpointinhibitoren, und gleichzeitig zu verbesserten Prognoseaussichten führen.

Summary

As the sixth most common tumor entity worldwide with a 5-year survival rate of around 55%, squamous cell carcinoma of the head and neck are among the most common tumors in humans and are associated with an unfavorable prognosis. In addition, despite intensive research efforts in recent decades, treatment options are still limited, partly due to the commonly late diagnosis. The often-advanced tumors also generate an immunosuppressive tumor microenvironment, which further limits drug therapy options. All together this implies the need to develop new therapeutic options. With its antitumor and immunostimulatory effects, which has been increasingly proven in the literature, vitamin-D offers a promising approach. Several studies in recent years have shown that patients with head and neck tumors often suffer from vitamin-D-deficiency, which in turn is associated with a poorer prognosis. Against this background, the present study investigated the influence of the vitamin-D-status of head and neck tumor patients on the antitumor immune defense by means of a differentiated analysis of the immunological tumor environment.

For this purpose, tissue samples from 116 head and neck tumor patients were stained immunohistochemically, the expression behavior of five target proteins was analyzed and correlated with the patients' vitamin-D-serum-levels. Specifically, CD20, CTLA4, FasL, FoxP3, and IL10 were examined. Vitamin-D-deficiency was defined as a 25-OH-vitamin-D-serum-level below 10 ng/ml, which was the case for 63 patients, whereas 53 patients had a level above 25 ng/ml and thus belonged to the sufficiently vitamin-D-supplied patients of the collective. The immunohistochemical staining was then evaluated semi-quantitatively using an immunoreactive score, which was modified for two of the five target proteins and extended for further two target proteins in order to ensure optimal evaluation. The intratumoral and peritumoral immunological tumor microenvironment was evaluated separately for all markers.

The immunohistochemical analyses showed a positive correlation between an adequate vitamin-D-supply and an increased infiltration of CD20 expressing cells (B lymphocytes), most impressively in the case of CD20. Tumoral infiltration with B lymphocytes was statistically significantly increased with a sufficient vitamin-D-supply ($p=0.0289$), while in peritumoral tissue there was a clear tendency towards increased infiltration ($p=0.0662$). The statistical analysis of the molecules CTLA4, FasL, FoxP3 and IL10 showed no statistically significant correlation with the vitamin-D-serum-level of the patients. However, the extent of infiltration of the tumor microenvironment with the immune cell populations examined by the aforementioned markers showed a significant influence on the overall survival of patients. In particular increased intratumoral infiltration of CD20 expressing cells and peritumoral infiltration of CTLA4 expressing cells correlated statistically significantly with prolonged overall survival ($p=0.0401$ and $p=0.0398$). Increased peritumoral infiltration CD20 expressing

1. Zusammenfassung

cells and intratumoral infiltration CTLA4 expressing cells also showed a significant tendency towards prolonged overall patient survival ($p=0.1394$ and $p=0.0604$). FoxP3 as a surrogate marker for regulatory T-cells showed a small, non-significant trend towards prolonged overall survival with high peri- and intratumoral infiltration of the expressing cells ($p=0.3421$ and $p=0.5964$). Increased infiltration of FASL and IL10 expressing leukocytes did not result in a significant survival benefit. Overall, patients in the investigated population with an adequate vitamin-D-supply showed a statistically significant increase in overall survival compared to patients with a vitamin-D-deficiency ($p=0.0233$), irrespective of the markers described above.

In summary, the results obtained in the present study demonstrate that a sufficient serum vitamin-D-level in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is of immense importance for the prognosis and therapy prospects. The influence of vitamin-D on the immune infiltration of the tumor microenvironment and the effector molecules of individual leukocyte subpopulations was clearly demonstrated in this study and suggests a stimulating effect on the antitumor activity of the immune system in head and neck cancer patients. In the future, further molecular genetic studies are necessary to decipher additional immunomodulatory modes of action and the antitumor potential of vitamin-D. Besides the guideline-compliant and currently established multimodal therapy of head and neck tumors, the cost-effective substitution of vitamin-D could lead to an increase in the effectiveness of existing therapeutic options, in particular the already clinically established immunotherapy with checkpoint inhibitors, and at the same time to improved prognostic prospects.

2. Einleitung

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

Als Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) sind die epithelialen Tumore der Schleimhaut des Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, der Mundhöhle und der Lippe definiert. Insgesamt machen Tumore der Mundhöhle und des Larynx mit 70% den größten Anteil der HNSCCs aus (Robert Koch-Institut, 2016). Es handelt sich bei HNSCCs insgesamt um die sechst häufigste Krebsart mit weltweit ca. 350.000 neuen Erkrankungen pro Jahr, verursacht vor allem durch den chronischen Konsum von Tabak und Alkohol und zunehmend auch durch eine Infektion der Schleimhaut durch high-risk humane Papillomviren (HPV) (Leemans et al., 2011). Bei näherer Betrachtung der epidemiologischen Entwicklung der einzelnen HNSCC-Typen ergeben sich dabei unterschiedliche Tendenzen. Auf der einen Seite sinkt die Inzidenz von alkohol- und nikotininduzierten Tumoren, was im Wesentlichen auf den Rückgang der Prävalenz der traditionellen Risikofaktoren insbesondere in den westlichen Industrienationen bedingt ist. Auf der anderen Seite steigt die Häufigkeit oropharyngealer, HPV-assoziiertes Karzinome, verbunden mit dem steigenden Auftreten von HPV-Infektionen (D'Souza et al., 2007). Nicht verbessert hat sich jedoch die Überlebensrate, u.a. auf Grund der unverändert hohen Rate lokoregionärer Rezidive, Fernmetastasen und Zweitumoren sowie der eingeschränkten Therapieoptionen (Leemans et al., 2011).

2.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Ätiologie

Im Jahr 2020 erkrankten in Deutschland rund 11.400 Männer und 4.600 Frauen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Robert Koch-Institut, 2020). Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Männern bei ca. 66 Jahren und bei Frauen bei ca. 68 Jahren. Männer erkranken also tendenziell früher als Frauen und auch mehr als doppelt so häufig. Seit 2011 verlaufen die altersstandardisierten Erkrankungsrate für Frauen konstant, unter Männern ist ein geringer Rückgang zu vernehmen. In gleicher Weise hat sich auch die Mortalitätsrate der beiden Geschlechter entwickelt (Abb. 1). Im Jahr 2020 führten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs zu 1.600 Todesfällen unter Frauen und zu 5.000 Todesfällen unter Männern. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen tendenziell höher, was vermutlich u.a. an einem geringeren Auftreten von schnell zum Tode führenden Krebsarten wie beispielsweise Mundboden-, Zungen- oder Rachentumoren liegt. 84% der Karzinome des Rachens und der Mundhöhle erweisen sich als Plattenepithelkarzinome und lediglich 3% als Adenokarzinome, die dann besonders in den Speicheldrüsen lokalisiert sind

2. Einleitung

(Robert Koch-Institut, 2020). Für die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich histologisch gesicherte Plattenepithelkarzinome verwendet.

Studien der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass sich die Kopf-Hals-Karzinome innerhalb großer präneoplastischer Felder des Schleimhautepithels entwickeln, die aus genetisch veränderten Zellen bestehen und klonal mit dem Karzinom verwandt sind. Häufig dehnen sie sich bei der operativen Entfernung des Karzinoms auf die Operationsränder aus und können so Rezidive und Zweittumore verursachen. Die meisten HNSCCs besitzen grenzenloses Replikationspotenzial durch Abschalten des p53- und Retinoblastom-Gens. Andere behaupten sich durch somatische Veränderung im EGFR-Gen (epidermal growth factor receptor). Durch somatische Mutation von Schlüsselgenen oder Chromosomenverlust können sie außerdem auch dem wachstumshemmenden TGF β Signalweg entkommen (Leemans et al., 2011).

Es konnten durch zahlreiche Studien einige Risikofaktoren identifiziert werden, die zu den genannten molekularen Veränderungen der Schleimhaut und dadurch zur gesteigerten Zellteilung führen mit entsprechender Prädisposition zur Entwicklung von HNSCCs. Dazu zählen besonders die beiden Haupt-Noxen Tabakkonsum und Alkoholabusus. Sobald diese beiden Faktoren gleichzeitig bei einem Patienten vorliegen, kommt es zu einem multiplikativen Effekt und es resultiert ein 150-fach erhöhtes Karzinomrisiko (ab >20 pack years und 75 g Alkohol/Tag) (Hashibe et al., 2009; Reiß, 2021). Weitere Risikofaktoren bei der Entstehung von Kopf-Hals Tumoren sind eine Immunsuppression, ein chronischer Eisenmangel oder eine Bestrahlung in der Vorgeschichte. Auch physikalische Noxen wie die Exposition der Schleimhäute gegenüber Asbestfasern oder Holzstaub können insbesondere Larynxkarzinome verursachen (Robert Koch-Institut, 2020). Bei Larynxkarzinomen spielen unter anderem auch Präkanzerosen wie Larynxpapillome eine Rolle. Dem Mundhöhlenkarzinom können ätiologisch eine schlechte Mundhygiene und mechanische Störungen, wie nicht gut angepasste Zahnprothesen zu Grunde liegen, während Lippentumoren vor allem durch Sonnenexposition getriggert werden. Zusätzlich sind einige Karzinome mit bestimmten Viren assoziiert, wie das Nasopharynxkarzinom mit einer Epstein-Barr-Virus-Infektion und das Oropharynxkarzinom mit einer chronischen Infektion der Schleimhäute mit high-risk humanen Papillomviren (HPV). Beim Nasopharynxkarzinom wurde außerdem ein Zusammenhang zum Verzehr größerer Mengen nitrosaminhaltiger Lebensmittel (chemische Karzinogene), wie beispielsweise gesalzenem Fisch, nachgewiesen (Reiß, 2021; Robert Koch-Institut, 2020). Da die Pathogenese der Nasopharynxkarzinome abweichend zu den anderen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs hauptsächlich viralen Ursprungs ist und sich auch deren Therapie grundsätzlich von den übrigen HNSCCs unterscheidet, wurden diese in der vorliegenden Arbeit nicht näher betrachtet.

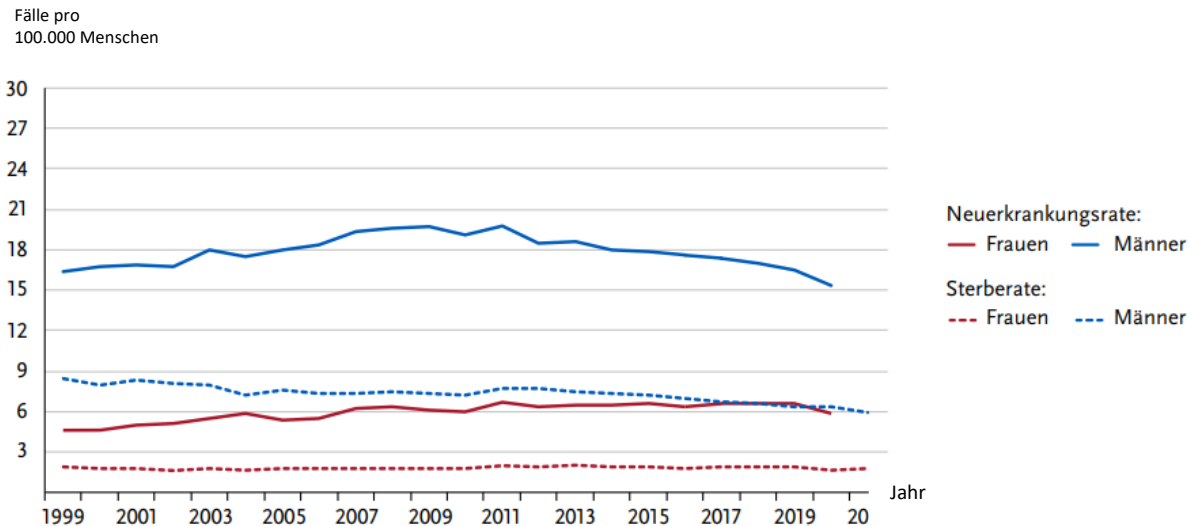


Abbildung 1: Nach Geschlecht differenzierte, altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate (je 100.000) für maligne Tumoren der Mundhöhle und des Rachens. Gesammelt wurden die Daten in Deutschland, zwischen 1999-2020/2021. Abbildung modifiziert nach der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregisterdaten, 2020 (Robert Koch-Institut, 2020).

2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Zur Diagnostik von bösartigen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gehört im ersten Schritt die Anamnese, die vor allem auf die gegenwärtige und in der Vergangenheit liegende Exposition mit Gefahrenstoffen und auf charakteristische Symptome abzielt. So kommt es durch das Mundhöhlenkarzinom gehäuft zu Foetor ex ore und Dysphagie, durch das Larynxkarzinom zu langanhaltender Heiserkeit und durch das Pharynxkarzinom je nach genauer Lokalisation unter anderem zu einer Schalleitungsschwerhörigkeit, behinderter Nasenatmung, Ohrenscherzen, Schluckbeschwerden, Globusgefühl und kloßiger Sprache. Auch unklare Schleimhautveränderungen mit erhöhter Blutungsneigung, die länger als zwei Wochen besteht, sowie Schwellungen am Hals können Symptome eines HNSCCs sein (Robert Koch-Institut, 2020; Wolff et al., 2012).

Als Teil der Primärdiagnostik bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines HNSCCs sollte als Goldstandard, im Anschluss an eine ambulante HNO-ärztliche Spiegel-Untersuchung, eine Panendoskopie mit bioptischer Probenentnahme durchgeführt werden. Die Panendoskopie gliedert sich dabei in die Naso-, Oro- und Hypopharyngoskopie. Des Weiteren wird die Untersuchung durch eine Mikrolaryngoskopie, Tracheobronchoskopie und Ösophagogastroskopie ergänzt. Sonographisch sollten die zervikalen Lymphknoten, sowie das Abdomen im Rahmen des Stagings untersucht werden. Eine Schnittbildgebung durch ein CT und/oder MRT von Hals, Thorax und ggf. Abdomen, sowie gegebenenfalls ein 18F-FDG-PET-CT sollten ebenfalls erfolgen (Snijders & Brakenhoff, 2018). Diese Untersuchungen dienen der genauen Ausdehnungsbestimmung des Tumors, der Detektion

2. Einleitung

von ggf. vorliegenden Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie, gemeinsam mit der Panendoskopie, dem Ausschluss des Vorliegens eines Zweittumors. Beim Larynxkarzinom kann in bestimmten Fällen eine zusätzliche Stroboskopie zur Darstellung der phonatorischen Stimmlippenbeweglichkeit hilfreich sein (Robert Koch-Institut, 2020).

Die immer noch in vielen Teilen unbekannte molekulare Karzinogenese des HNSCCs und die große Heterogenität in Genetik und Biologie behindern die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und haben u.a. dazu geführt, dass sich die Therapiegrundsätze von HNSCCs in den vergangenen Jahrzehnten kaum geändert haben (Leemans et al., 2011). Die Therapie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, u.a. dem TNM-Stadium, den Komorbiditäten und dem Nachweis von HPV bei Oropharynxkarzinomen. Etwa ein Drittel der Patienten weist zum Diagnosezeitpunkt einen Tumor im Frühstadium auf, während in zwei Drittel der Fälle bereits ein lokal fortgeschrittenes Stadium mit Vorliegen von Lymphknotenmetastasen diagnostiziert wird. Bei Tumoren im Frühstadium besteht die Möglichkeit einer operativen Tumoresektion, je nach Lokalisation entweder von außen oder transoral „kaltchirurgisch“, mittels CO₂-Laser oder robotisch assistiert (transoral robotic surgery, TORS). Eine in diesen Stadien onkologisch und funktionell als gleichwertig anzusehende Alternative stellt eine primäre Bestrahlung dar. Bei fortgeschrittener Tumorerkrankung (locally advanced, LA) stehen eine primär chirurgische Therapie mit Tumoresektion einschließlich einer Entfernung der Halslymphknoten (Neck dissection) und ggf. plastischer Rekonstruktion, sowie eine primärdefinitive Radiochemotherapie zur Verfügung. Bei der primär operativen Therapie sollte nach Möglichkeit ein Erhalt der Stimm- und Schluckfunktion angestrebt werden. Bei Notwendigkeit einer kompletten Kehlkopfentfernung ist über die Ösophagusersatzstimme, Stimmprothesen, oder eine elektronische Sprechhilfe eine Stimmrehabilitation möglich (Reiß, 2021). In den meisten Fällen folgt auf eine primär-chirurgische Therapie je nach histopathologischem Tumorstadium noch eine adjuvante Radiatio oder auch Radiochemotherapie, sodass bei den meisten Patienten eine multimodale Therapie erforderlich ist. Diese ist für die Patienten häufig mit langfristigen Einschränkungen der Lebensqualität verbunden, u.a. bedingt durch eine dauerhafte Xerostomie, Dysphagie, chronische Schmerzen, Dysphonie und Stigmatisierung durch die meist von außen sichtbaren Narben und Gewebedefekte.

Trotz dieses meist multimodalen, sehr intensiven Therapiekonzeptes entwickeln im weiteren Verlauf auch nach initial kurativ intendierter Behandlung ca. 50% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Erstdiagnose ein Lokalrezidiv, einen Zweittumor im Kopf-Hals-Bereich oder Fernmetastasen (recurrent/metastatic disease, RM). Für diese Situation wurden in den zurückliegenden Jahren neue Therapiekonzepte auf dem Gebiet der Immuntherapie entwickelt, die die Therapieoptionen für RM-HNSCC-Patienten wesentlich erweitert und deren Prognose verbessert haben. So konnten in den letzten 5 Jahren zwei gegen PD1

gerichtete Antikörper basierend auf den Daten umfangreicher, prospektiver, multizentrischer Phase-III-Studien zugelassen und in den klinischen Alltag eingeführt werden. Nivolumab (Checkmate-141 Studie, Zulassung seit Anfang 2017) und Pembrolizumab (Keynote-040 Studie, Zulassung seit Mitte 2018) sind indiziert zur Zweitlinientherapie von RM-HNSCC-Patienten in einer platin-refraktären Situation, also mit einem Rezidiv und/oder Fernmetastasen während oder maximal 6 Monate nach einer Platin-basierten Therapie, die entweder als primäre Radiochemotherapie oder adjuvante Radiochemotherapie oder in palliativer Intention z.B. im Rahmen des EXTREME-Protokoll gegeben wurde. Dabei kann Nivolumab unabhängig von der PD-L1-Expression der Tumorzellen eingesetzt werden, für den Einsatz von Pembrolizumab wird ein sog. tumor proportion score (TPS) $\geq 50\%$ gefordert. Basierend auf den Ergebnissen der KEYNOTE-048-Studie kann Pembrolizumab zudem bereits in der Erstlinienbehandlung von RM-HNSCC-Patienten eingesetzt werden, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit einer Platin-basierten Chemotherapie, sofern der sog. combined positivity score (CPS) einen Wert von 1 übersteigt (Burtneß et al., 2019; E. E. W. Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016). Über die genannten PD1-Antikörper hinaus kann zudem der gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtete Antikörper Cetuximab eingesetzt werden, entweder kombiniert mit einer Strahlentherapie im adjuvanten Setting (Leemans et al., 2011) oder aber kombiniert mit verschiedenen Chemotherapeutika für eine palliative Systemtherapie in der RM-Situation im Rahmen des EXTREME- oder TPEX-Protokolls. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass diese Formen der zielgerichteten Therapie einschließlich der Immuntherapie eine Option für nur wenige Patienten basierend auf den Zulassungen der Substanzen darstellt und die objektive Ansprechrates weiterhin deutlich unter 30% liegt (Ferris, 2015). Folglich sind neben weiteren klinischen Studien zu einer Ausweitung der Therapieindikationen der Immuntherapie in Zukunft vor allem präventive Maßnahmen, die leicht zu finanzieren und einfach in der Anwendung sind, von entscheidender Bedeutung für die Verbesserung der Prognose von HNSCC-Patienten. Sie sollten allgemein das Immunsystem unterstützen und die spezielle körpereigene Tumorabwehr fördern. Auch muss die Grundlagenforschung sowie die klinisch-translazionale Forschung auf dem Gebiet der Kopf-Hals-Onkologie deutlich intensiviert werden, da zu zahlreichen in anderen Tumorentitäten bereits erfolgreich eingesetzten Therapieformen wie beispielsweise der zellbasierten Immuntherapie (u.a. CART), Antikörper-Wirkstoffkonjugaten (ADC) oder der Tumorstimmulierung nur sehr spärliche Daten generiert wurden und damit verbunden kaum Evidenz existiert.

Die Prognose für Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs wird weitestgehend durch das Stadium bei der Erstdiagnose bestimmt. Dabei bestimmen die Ausdehnung, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen das TNM- und klinische Tumor-Stadium (Leemans et al., 2011). Wegen den erst spät einsetzenden Erstsymptomen

2. Einleitung

ist die Prognose des Pharynxkarzinoms aufgrund der meist bei Erstdiagnose bereits fortgeschrittenen Erkrankung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 15-50% eher schlecht. Das Hypopharynxkarzinom hat dabei von allen Plattenepithelkarzinomen im Bereich des Rachens die schlechteste Prognose (Reiß, 2021). Vorteilhaft hinsichtlich der Prognose von Oropharynxkarzinomen ist der Nachweis einer HPV-assoziierten Tumorerkrankung (Ang et al., 2010). Von prognostischer Bedeutung ist zudem die Frage, ob auch nach Diagnose ein Nikotinkonsum fortgeführt wird, sowohl für HPV-assoziierte wie auch für HPV-unabhängige HNSCCs. Die beste Prognose unter den HNSCCs haben glottische Larynxkarzinome, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90%, da diese früh durch eine chronische Heiserkeit symptomatisch werden und nur sehr selten Lymphknotenmetastasen bilden. Sub- und supraglottische Larynxkarzinome haben mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 40% eine deutlich schlechtere Prognose (Reiß, 2021).

Letztendlich wird deutlich, dass die Prognoseaussichten von bösartigen Kopf-Hals-Tumoren mit einer für alle Entitäten zusammengefassten, durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 55% weiterhin sehr begrenzt und seit Jahrzehnten nahezu unverändert schlecht sind (Robert Koch-Institut, 2016). Umso wichtiger wird es, neben neuen Verfahren in der Diagnostik zur Früherkennung von HNSCCs, auch neue therapeutische Ansätze zu erforschen, um die Prognoseaussichten zu verbessern und die Überlebensraten zu steigern. Von wesentlicher Bedeutung sind zudem präventive Maßnahmen.

2.2 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem besitzt einen hohen Rang an Komplexität, was an seiner wichtigen Aufgabe liegt, pathogene Erreger vom Eindringen in den Organismus abzuhalten. Es dient dem Schutz vor Erkrankungen und bietet dafür einige Mechanismen mit unterschiedlichsten Aufgaben und Funktionsweisen. Bei so vielen Faktoren, die abgestimmt zusammen arbeiten ist absehbar, dass auch viele Pathologien und Fehlregulationen auftreten. Auf diese Weise kann es zu Autoimmunerkrankungen und der Entstehung maligner Tumorerkrankungen kommen. So konnte dem Immunsystem auch bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Kopf-Hals-Tumoren eine Schlüsselrolle zugeschrieben werden. Wichtig ist es diese Dysregulationen und die spezifische Umgehung des Immunsystems zu verstehen, da dies die Grundvoraussetzung ist, um an neuen Therapiemöglichkeiten zu arbeiten (Ferris, 2015; Kansy et al., 2015; Mandal et al., 2016).

Die Immunantwort auf exogene oder endogene Reize lässt sich in eine angeborene, unspezifische und in eine erworbene, spezifische oder auch adaptive Reaktion einteilen. Diese unterscheiden sich wiederum je nach Mediatoren in eine zelluläre und humorale

(lösliche) Komponente. Die erste, schnelle Abwehr infektiöser Erreger erfolgt über die angeborene Immunreaktion. Sie kommen erst zum Einsatz, wenn äußere, physikalische und biomechanische Schutzbarrieren wie die Haut, die Magensäure oder auch die Flimmerhärchen der Atemwege kein Eindringen verhindern konnten. In dieser unspezifischen Antwort wird vorerst etwas Körperfremdes bekämpft, ohne die Identifizierung des Erregers zu erreichen. Gelingt keine vollständige Eliminierung der Pathogene, kommt es zum Einsatz des langsameren, adaptiven Immunsystems. Zur Induktion muss der Erreger erkannt werden, sodass sich Effektorzellen differenzieren und letztendlich sogar ein immunologisches Gedächtnis bilden. Bei einem erneuten Kontakt mit diesem oder ähnlichen Erregern kommt es zu einer deutlich schnelleren Immunreaktion (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018).

Auf Grund des bestätigten Einflusses von Vitamin-D auf das Immunsystem und den immunonkologischen Schwerpunkt dieser Arbeit soll im Folgenden ein allgemeiner Überblick über die humorale und zelluläre Komponente des Immunsystems gegeben werden.

2.2.1 Humorale Komponenten

Die Basis der humoralen Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind im Blut zirkulierende Proteine, wie antimikrobielle Peptide und Enzyme. Hierunter fallen beispielsweise Defensine, toxisch für Viren, Pilze, Hefen und Bakterien, Cathelicidine, die zusätzlich chemotaktisch wirken und das in Mucus, Speichel und Tränenflüssigkeit vorkommende Lysozym (Rink et al., 2018). Sie sind häufig der Erstkontakt zum Erreger und werden größtenteils von den Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten aber auch von Epithelzellen gebildet. Die weitere Immunantwort wird von den Proteinen über Vasodilatation, Chemotaxis, Aktivieren und Proliferieren von Immunzellen und Abtöten des Erregers initiiert. Zu den zum angeborenen Immunsystem zählenden Plasmaproteinen gehören die Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem sowie proinflammatorische Zytokine (Hof et al., 2017). Zu den wichtigsten der ca. 40 Akute-Phase-Proteinen (APP), die durch Freisetzung von IL6 in der Leber produziert werden gehört das C-reaktive Protein (CRP), das die Opsonierung von Erregern steigert, Ferritin, welches Pathogenen Eisen entzieht und Procalcitonin (Pannen & Robotham, 1995; Rink et al., 2018). Die Konzentration dieser Plasmaproteine kann sich während einer akuten Entzündung um mindestens 25% verändern. Das CRP beispielsweise, steigt auf das bis zu 1000-Fache, weshalb es ein häufiger diagnostischer Marker bei Entzündungsreaktionen des Körpers ist (Rink et al., 2018). Auf der anderen Seite existieren negative APP wie Albumin und Transferrin, deren Konzentration in der akuten Phase einer Entzündung sinkt. Das Komplementsystem vervollständigt die Funktion der Antikörper und verknüpft somit angeborenes mit erworbenem Immunsystem. Es kommt als regulärer Bestandteil des Blutplasmas vor und

2. Einleitung

besteht aus mehr als 60 verschiedenen Komponenten und gespalteten Fragmenten, die über Wechselwirkungen und enzymatische Aktivitäten Effektormoleküle generieren (Hof et al., 2017). Aktiviert wird die Kaskade der Komplementfaktoren über drei verschiedene Wege, die sich in ihrer Aktivierung und je nachdem ob dabei Antikörper zum Einsatz kommen oder nicht unterscheiden (Pouw & Ricklin, 2022). Der klassische Weg erfolgt über Antigen-Antikörper Komplexe im Rahmen der adaptiven Immunabwehr. Als zweite Möglichkeit existiert der alternative Weg, indem sich das C3-Protein direkt an eine mikrobielle Oberfläche anlagert. Als letzter Weg erstreckt sich der MBL-Weg (mannosebindendes Lektin), indem Lektin an die Mannose auf einer Bakterienoberfläche bindet. Am Ende steht immer ein sogenannter Membrane Attack Complex (MAC) und es kommt zur Opsonierung, Chemotaxis, Entzündung und Lyse bakterieller Erreger sowie zur Aktivierung von B-Zellen und Entsorgung von Immunkomplexen (Hof et al., 2017; Pouw & Ricklin, 2022; Rink et al., 2018). Zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen gehören die Interferone Alpha, Beta und Gamma, der Tumornekrosefaktor, die Interleukine 1, 2, 4 und 6 sowie Prostaglandine und Leukotriene (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018). Sie stellen eine heterologe Gruppe von Glykoproteinen dar, von denen aus historischen Gründen viele als Interleukine bezeichnet und durchnummeriert werden (Hof et al., 2017). Primär sind sie der angeborenen Immunabwehr zugehörig und tragen maßgeblich zur lokalen und systemischen Erregerabwehr bei, regulieren gleichzeitig aber auch die adaptive Immunreaktion. Ihre Funktionen finden sich unter anderem in der Aktivierung von Immunzellen (IL6, IL1), in der gegenseitigen Regulation (IL6 und IL1), im Beeinflussen der APP (IL6 und TNF α) und von Gefäßen (TNF α), sie initiieren Degranulationen von neutrophilen Granulozyten (TNF α) und eine Chemotaxis (IL8) und stellen über die Stimulation von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) eine wichtige Verbindung zur erworbenen zellulären Immunreaktion dar (IL12) (Hof et al., 2017).

Die humorale Komponente des erworbenen Immunsystems wird im Wesentlichen durch die fünf verschiedenen Immunglobulintypen repräsentiert. Die Wirksamkeit dieser, zeigt sich über drei Fähigkeiten: Die Neutralisation, das Komplementsystem und die Bindung an Fc-Rezeptoren (Hof et al., 2017). Sie schließen die Lücken in der spezifischen Abwehr, wenn T-Lymphozyten mit ihren Effektormechanismen bei einer zellfreien Ausbreitung eines Erregers, wie beispielsweise bei Viren, nicht erfolgreich sind. Zusätzlich können Exotoxine neutralisiert werden, es kann bei sehr dichtem Besatz von Viren deren Virusreplikation behindert werden und auch Bakterien können nicht mehr an Zellen anheften, sobald Antikörper diese notwendigen Strukturen besetzen (Hof et al., 2017). IgG ist der im Blut am häufigsten vorkommende Isotyp. Er entfaltet seine Wirksamkeit in der späten Immunantwort im Blut selbst, oder durch seine sehr gute Diffusionsfähigkeiten, auch im infizierten Gewebe. Zusätzlich ist er plazentagängig, was für einen maternalen Schutz des ungeborenen Fetus sorgt. Daneben sorgt IgM als größter Antikörper, mit dementsprechend vielen

Bindungsstellen, für eine frühe Immunantwort. Der Isotyp IgA, der sich vor allem in Körperflüssigkeiten wiederfindet, wird über besondere Transportprozesse in die Schleimhautsekrete sezerniert. IgE wiederum ist bedeutend bei der Parasitenabwehr und allergischen Reaktionen und IgD findet seine Funktion in der Reifung von B-Lymphozyten (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018).

2.2.2 Zelluläre Komponenten

Neben den humoralen Komponenten der Immunreaktionen existiert auch eine zelluläre Abwehr, der je nach Betrachtung der adaptiven oder natürlichen Immunreaktion unterschiedliche Zelltypen angehören. Diese Zellen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor, die sich in myeloide und lymphoide Vorläuferzellen und dann in die jeweiligen Zellreihen weiterentwickeln. Aus der myeloiden Zellreihe gehen die eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, die Mastzellen, die konventionell dendritischen Zellen und Monozyten, sowie die Erythrozyten und Thrombozyten hervor. Dem lymphoiden Ast des Stammbaumes entspringen die natürlichen Killerzellen, plasmazytoide dendritische Zellen, sowie die B- und T-Lymphozyten (Rink et al., 2018).

Entkommen infektiöse Agenzien den chemischen und physikalischen Barrieren, kommen diese in der Regel als nächstes mit Phagozyten in Kontakt. Zu diesen zählen Monozyten und neutrophile Granulozyten, welche im Blut frei zirkulieren und die im Gewebe vorkommenden und aus den Monozyten hervorgehenden Makrophagen (Rink et al., 2018). Ebenfalls dazugehörig sind sogenannte dendritische Zellen (DC), die an erster Stelle der Induktion einer Immunantwort stehen, indem sie als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen mit T-Zellen interagieren sowie Zytokine sezernieren und somit auch ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen (Rink et al., 2018). Über die Phagozytose können Erreger in ein Phagosom aufgenommen, dort verdaut und zerstört werden, wobei gleichzeitig je nach Phagozyt antibakterielle Wirkstoffe, Defensine und andere Regulatorsubstanzen freigesetzt werden (Hof et al., 2017). Neutrophile Granulozyten wirken ebenfalls über die Sezernierung einiger Zytokine (Chemerin, BlyS), welche wiederum chemotaktische Reize auf dendritische Zellen ausüben und die Proliferation sowie Differenzierung von B-Lymphozyten fördern. Die ebenfalls von Makrophagen aber auch von prinzipiell allen viral infizierten Zellen sezernierten Interferone, wirken vornehmlich virostatistisch. Daneben schaffen sie eine Vernetzung zur spezifischen Immunabwehr, indem sie die Aktivität von NK-Zellen hochregulieren und die MHC-Klasse-I-Molekül-Präsentation (major histocompatibility complex) auf den infizierten Zellen steigern (Hof et al., 2017). NK-Zellen selbst produzieren auch Interferone, besonders IFN γ aber auch andere Zytokine. Weiterhin bekämpfen sie vorwiegend intrazelluläre Parasiten, aber auch Tumorzellen, indem sie zytotoxisch wirken. Außerdem sorgen sie für eine regelrechte Expression der MHC-

2. Einleitung

Klasse-I-Moleküle, sodass CD8⁺-T-Lymphozyten die präsentierenden Zellen besser erkennen und lysieren können (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018). Ebenfalls zur zellulären Komponente der angeborenen Immunreaktion gehören wie oben bereits erwähnt dendritische Zellen. Diese können in regionale Lymphknoten aber auch in sekundär lymphatische Organe mobilisiert werden, wo sie naiven T-Lymphozyten als Antigene wirkende Peptide präsentieren. Daneben synthetisieren sie sogenannte B7-Moleküle, die für die Aktivierung von T-Lymphozyten essenziell sind (Rink et al., 2018).

Die zellulären Komponenten der erworbenen Immunabwehr gliedern sich hauptsächlich in B- und T-Lymphozyten (Hof et al., 2017). Während fast alle Immunzellen im Knochenmark heranreifen, wandern T-Vorläuferzellen aus und begeben sich über das Blut in den Thymus. Da T-Lymphozyten Peptide nur im Zusammenhang mit MHC-Molekülen erkennen können, müssen Antigene in kleinere Peptide zerlegt werden, bis die MHC-Moleküle sie an die Oberfläche transportieren und präsentieren (Rink et al., 2018). T-Lymphozyten müssen zudem in einem ersten Schritt aktiviert werden. Dies erfolgt über die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen über einen MHC-Komplex, der wiederum die Produktion der B7-Moleküle der dendritischen Zellen steigert (Hof et al., 2017). Diese B7-Moleküle (CD80 und CD86) interagieren mit dem CD28-Molekül auf den naiven T-Lymphozyten, was zur endgültigen Aktivierung führt, sodass die T-Lymphozyten in einen Status intensiver Zellteilungen überführt werden. Über IL2, das als autokriner Wachstumsfaktor fungiert und nun vermehrt sezerniert wird, kommt es zur Differenzierung der T-Lymphozyten in Effektorzellen. Es existieren costimulierende Moleküle, die zu einer gesteigerten T-Zell-Proliferation führen, da sie für eine hochregulierte Expression der B7-Moleküle sorgen, aber auch andere Moleküle, wie beispielsweise das vom T-Lymphozyt exprimierte CTLA4 (CD152), das zu einer Unterbindung der T-Zell-Differenzierung führt (siehe Kapitel zu CTLA4) (Rink et al., 2018). Nun können die Zellen über das Blut und die Lymphe zum Infektionsort vordringen und bei Interaktion mit einem passenden MHC-Komplex ihre Effektorfunktionen ausführen. Während der Differenzierung im lymphatischen Gewebe kann man CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen voneinander unterscheiden. CD4⁺-T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptide, welche an MHC-II-Moleküle gebunden sind. MHC-II-Moleküle kommen nur auf antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten vor. Ihre präsentierten Peptide stammen aus der extrazellulären Flüssigkeit, sodass es sich beispielsweise um Viren, Bakterien und Tumoreoantigene handelt. Sie zeigen an, dass sich Krankheitserreger nicht mehr in einer Zelle, sondern bereits im Körper befinden (Rink et al., 2018). Über die CD4⁺-T-Zellen wird eine Immunantwort über Zytokine koordiniert. CD4⁺-T-Zellen differenzieren sich weiter in vier unterschiedliche CD4⁺-T-Effektorzellen (T-Helferzellen), je nach Zytokinsekretion der dendritischen Zellen, die von deren Erregerkontakt abhängt. So kommt es beispielsweise

durch Kontakt mit Hefen und Pilzen über die Sezernierung der DCs von IL6 und TGF β zur Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen zu TH17-Zellen, bei Kontakt mit Bakterien über TGF β zu T^{REG}-Zellen und bei Viren über IL12 und IFN γ zu TH1-Zellen. Die Differenzierung in Richtung TH2-Zellen erfolgt über die Sezernierung von IL4 nach Kontakt der DCs mit Parasiten (Hof et al., 2017).

Diese T-Zellpopulationen wiederum haben alle unterschiedliche Funktionen. TH1-Zellen fungieren vornehmlich als Regulatoren bei Entzündungsreaktionen. Sie sezernieren unter anderem IFN γ , IL2 und aktivieren zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und Phagozyten und wirken bevorzugt gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Tumorzellen. TH2-Zellen stehen in engem Kontakt mit eosinophilen Granulozyten und sind so an der Abwehr von Infektionen durch Parasiten beteiligt. Sie schütten IL4, IL5, IL6, IL13 und IL10 aus, aktivieren dabei naive B-Zellen und veranlassen sie zur Antikörperproduktion sowie zu einem Isotypenswitch zu IgE und IgA. TH17-Zellen wirken proinflammatorisch und setzen IL17, IL21, IL22 und IL26 frei. So veranlassen sie eine Chemotaxis über lokale Gewebszellen, die Granulozyten anlocken. Sie arbeiten eng mit TH1- und TH2-Zellen zusammen. Regulatorische T-Zellen (T^{REG}-Zellen) wirken immunsuppressiv und führen zur Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion, indem sie IL10 und TGF β sezernieren (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018). Es existieren weitere Unterpopulationen der T^{REG}, wobei man unter den wichtigsten die natürlichen, FoxP3-positiven (nT^{REG}, forkhead box P3) von den induzierbaren, regulatorischen T-Zellen (iT^{REG}) unterscheidet (Rink et al., 2018). Während die Differenzierung der natürlichen T^{REG} im Thymus erfolgt und diese ihre Hauptfunktion in der Suppression von Autoimmunreaktionen haben, entstehen die induzierbaren T^{REG} bei Antigenkontakt außerhalb des Thymus. Sie sind bei der Unterdrückung von eigentlich nicht erwünschten Immunreaktionen beteiligt, so zum Beispiel gegen Bestandteile der Nahrung oder gegen die Darmflora (Hof et al., 2017). Indem die T^{REG} TGF- β sezernieren, sofern kein invasiver Infektionserreger vorliegt, wirken sie supprimierend auf TH1- und TH2-Zellen. Auf den Transkriptionsfaktor der T^{REG} wird im FoxP3 Kapitel näher eingegangen. Weitere Marker für die T^{REG} sind CTLA4 (cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4), CD35, GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene) und CD127 (Rink et al., 2018). Auch auf CTLA4 wird auch im Folgenden noch genauer eingegangen.

CD8⁺-T-Zellen nennt man auch zytotoxische T-Zellen oder Killerzellen. Sie interagieren mit MHC-Molekülen der Klasse I, die auf allen kernhaltigen Körperzellen sowie Thrombozyten vorkommen. Ihre präsentierten Peptide stammen aus dem Zytosol der Zellen, wie beispielsweise Tumorneoantigene, besonders auch Viren, Bakterien oder normale körpereigene Proteine. Sie geben damit an, ob eine Zelle infiziert ist oder nicht (Rink et al., 2018). Die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen erfordert starke Signale, was häufig die

2. Einleitung

gleichzeitige Aktivierung einer CD4⁺-T-Zelle durch die identische dendritische Zelle verlangt. Prinzipiell verläuft die Aktivierung dieser Zellpopulation ebenfalls über Kontaktaufnahme mit einer dendritischen Zelle über die MHC-I-Moleküle und in einem zweiten Aktivierungsschritt sind erneut die costimulierenden Moleküle CD80 und CD86 nötig. Anschließend expandieren und differenzieren sie ähnlich wie die CD4⁺-T-Zellen (Hof et al., 2017). Ihre Aufgabe ist nicht primär die Immunantwort, sondern eher die Tötung von Zellen, weswegen ihre Aktivierung stärker reguliert ist. Um die Apoptose in den Zielzellen auszulösen, sezernieren die CD8⁺-T-Zellen ihre Granula, die besonders aus Perforinen und Granzymen besteht. Die Perforine bilden dabei Poren, sodass die Granzyme in die Zellen eindringen können, wo sie Proteasen freisetzen, die die Apoptosekaskaden initiieren. Der alternative Weg der CD8⁺-T-Zellen, um die Tötung ihrer Zielzellen zu erreichen, ist rezeptorvermittelt. Diese Todesrezeptoren bestehen aus dem Fas-Molekül und dem Liganden Fas-L (siehe Kapitel FasL) (Rink et al., 2018).

Naive B-Zellen wandern ebenfalls in die sekundär lymphatischen Organe, um aktiviert zu werden. Anders als bei den T-Lymphozyten, sind hierfür keine MHC-Moleküle nötig, da der B-Zell-Rezeptor (BCR, membranständige IgM und später auch IgD) extrazelluläre Epitope der Antigene erkennen und binden kann (Hof et al., 2017). Nach Internalisierung und proteolytischer Spaltung werden die Peptide mit Hilfe von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Damit wird diese B-Zelle zur antigenpräsentierenden Zelle für beispielsweise CD4⁺-T-Lymphozyten, die von einer dendritischen Zelle mit dem gleichen Peptid aktiviert wurde (Hof et al., 2017; Rodríguez-Pinto, 2005). Anschließend kommt es unter dem Einfluss von IL4, das von der T-Zelle sezerniert wurde, zu Zellteilungen der B-Zelle. Dabei differenzieren einige zu frühen, antikörperproduzierenden Plasmazellen, andere wandern in den B-Zell-Follikel und bilden ein Keimzentrum. Dort erfolgt eine weitere Differenzierung, an deren Ende Plasmazellen stehen, deren sezernierte Antikörper hoch spezifisch für ihr Antigen sind. Auch können aus diesem Pool B-Gedächtniszellen hervorgehen (Hof et al., 2017). B-Zellen, die aktiviert sind und IgM produzieren, können in der späteren Reifung den konstanten Teil der schweren Kette austauschen, ohne dass der antigenbindende Teil beeinflusst wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als Isotypenswitch und er führt zur Produktion der anderen Antikörper-Subklassen wie IgG, IgA oder IgE. Da der konstante Teil die Informationen der biologischen Eigenschaften wie beispielsweise die Plazentagängigkeit trägt, entstehen Antikörper, die Zugang zu unterschiedlichen Kompartimenten haben (siehe humorale Komponente) (Hof et al., 2017). Wie ebenfalls weiter oben bereits erwähnt, können die Immunglobuline mit deren Fc-Fragment an Fc-Rezeptoren von NK-Zellen, Granulozyten und Phagozyten binden. In dieser, der angeborenen Immunabwehr zugehörigen Reaktion, werden deren Effektormechanismen aktiviert. Dies erfolgt allerdings nur, wenn es zu einer Quervernetzung kommt, indem mehrere Fc-Rezeptoren besetzt werden. Kommt es zur

Quervernetzung unter den Phagozyten, folgt die Phagozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes. Bei den NK-Zellen wird eine Freisetzung der Granula mit zytotoxischer Funktion ausgelöst, was wiederum eine Apoptose initiieren kann. Mastzellen, Basophile und Eosinophile, deren exprimierte Fc-Rezeptoren besonders hochaffin für IgE Moleküle sind, resultieren ebenfalls in der Degranulation von Zellen, sodass vasoaktive Substanzen (Histamin, Prostaglandine, Leukotriene) und chemoattraktive Zytokine freigesetzt werden (Hof et al., 2017).

Vorteil des adaptiven Immunsystems ist sein Potenzial zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, sodass bei einer erneuten Exposition mit gleichen Erregern eine viel schnellere und spezifischere Abwehr erfolgt. Hierfür werden bei jeder primären Immunantwort ein Teil der Lymphozyten in einen Zustand überführt, der sie langfristig rezirkulierend macht und in welchem man sie als Gedächtniszellen bezeichnet (Hof et al., 2017). B-Gedächtniszellen wurden größtenteils im Rahmen von Immunisierungen bei der Verabreichung von zwei Impfdosen beobachtet, wobei die erste Immunisierung in hohen IgM Spiegeln resultiert, während die zweite zu hohen IgG Spiegeln führt. Daneben existieren auch T-Gedächtniszellen, die vornehmlich den T-Effektorzellen gleichen und zu 100- bis 1000-fach stärkeren Immunantworten führen (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018).

2.2.3 Lymphozyten und ihre Moleküle

Das Gleichgewicht zwischen den Immuneffektorzellen in der Mikroumgebung eines Tumors dient der Modulierung der Immunantwort gegen bösartige Zellen. Da Immunantworten innerhalb der Mikroumgebung des Tumors wichtige Indikatoren für die individuelle Tumorbilogie sein können, sollen diese im Nachfolgenden näher betrachtet werden. Die Moleküle dieser tumorinfiltrierenden Leukozyten (TIL), speziell ihre Funktion und ihre Dichte im Mikromilieu u.a. von Kopf-Hals-Tumoren, spielen eine entscheidende Rolle für die Tumorbilogie sowie den klinischen Verlauf einer Tumorerkrankung und können sich je nach Ort und Ausdehnung des Tumors erheblich unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf leukozytäre Moleküle detailliert betrachtet, die jeweils verschiedene Aufgaben im Tumormikromilieu besitzen und im Folgenden näher beschrieben werden.

2.2.3.1 CD20

CD20 ist ein B-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül (Rink et al., 2018). Im Prozess der B-Zell-Reifung werden stadienabhängig schrittweise verschiedene CD-Oberflächenstrukturen (Cluster of differentiation) exprimiert. Als frühestes Molekül ist CD19 bereits ab der Pro-B-Zelle nachweisbar, danach folgt im späten Pro-B-Stadium CD20. Reife, ausdifferenzierte B-Zellen weisen CD21 und CD23 auf (Heinrich et al., 2014). CD20 wird bis hin zur Gedächtniszelle in steigender Konzentration exprimiert, nicht jedoch auf Plasmazellen

2. Einleitung

(Pavlasova & Mraz, 2020). Besonders bei Leukämien und Lymphomen ist der Nachweis dieser je nach Reifegrad vorhandenen CD-Strukturen für eine Differentialdiagnose wichtig. Lokalisiert ist CD20 in der Zellmembran, vermutlich als Calcium-Kanal (Bubien et al., 1993). Entsprechend seiner Expression auf B-Zellen, reguliert es deren Aktivierung, Proliferation und Interaktionen, indem es direkt für eine effiziente BCR-(B-Zell-Rezeptor)-Signalübertragung in B-Zellen erforderlich ist. Seine genaue Funktion in B-Zellen ist nach wie vor unklar (Pavlasova & Mraz, 2020). Allerdings konnte bei Patienten, die eine CD20 Mutation aufwiesen, eine verringerte Anzahl von zirkulierenden B-Gedächtnis-Zellen, ein reduzierter Isotypenwechsel der Immunglobuline und ein geringerer IgG-Spiegel nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei Versuchen an Mäusen, bei denen das CD20-Gen homozygot mutiert implantiert wurde, eine reduzierte Anzahl von B-Zellen im Keimzentrum. Dies deutet an, dass CD20 sowohl für eine optimale T-unabhängige als auch für eine T-abhängige Immunreaktion wichtig ist (Lund & Randall, 2010; Pavlasova & Mraz, 2020; Tedder et al., 1988). Ein monoklonaler Antikörper gegen CD20 (Rituximab) ist mittlerweile seit mehreren Jahren erfolgreicher Teil der Chemotherapie von B-Zell-Leukämien und -Lymphomen wie der CLL (chronische lymphatische Leukämie), dem folliculären Lymphom und dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (Barrett et al., 2017).

2.2.3.2 CTLA4

Das Oberflächenmolekül CTLA4 (cytotoxic T-Lymphocyte associated antigen 4; auch CD152) befindet sich auf CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, aber vor allem auch auf T^{REG}-Zellen. Es kann nach Aktivierung der T-Zellen von diesen gebildet werden (McCoy & Le Gros, 1999). Es ähnelt in seiner Struktur CD28, das für die Aktivierung der T-Zellen mit den costimulierenden Molekülen CD80/86 interagiert (Rink et al., 2018). CTLA4 unterscheidet sich von CD28 durch die höhere Bindungsstärke zu CD80/86 (B7.1 und B7.2) (Heinrich et al., 2014). Indem es auf T^{REG}-Zellen mit CD80/86 wechselwirkt, leitet es inhibitorische Signale weiter und es kommt zur Downregulation der Aktivierung von T-Zellen, da die Stimulation der T-Zellen über APC (antigen-presenting cells) beendet wird (Khailaie et al., 2018; Rink et al., 2018). Letztendlich sind T-Zellen nicht mehr empfindlich gegenüber IL2 (siehe Kapitel zelluläre Komponente der Immunantwort). CTLA4 terminiert also die T-Zell-Aktivierung und supprimiert die Immunantwort durch das Fördern der Bildung immunsuppressiver Zytokine und deren Rezeptoren anstelle inflammatorischer Signale. Damit beendet es implizit fehlgeleitete und überschießende Immunantworten, sorgt für eine ausgeglichene Immunantwort und schützt vor Immunreaktionen gegen körpereigene, nicht pathogene Strukturen (Heinrich et al., 2014; Rink et al., 2018). Würden T-Zellen nicht wie durch CTLA4 reguliert werden, könnten autoreaktive, fehlgeleitete Zellen dem Körper

massive Schäden zufügen (Wing et al., 2008). CTLA4 dient desweiteren der einfachen Beendigung einer physiologischen Immunreaktion (Rink et al., 2018).

2.2.3.3 FasL

Fas-Ligand (FasL, CD178, Apo-1) ist ein Transmembranprotein der TNF α -Familie (member 6) und wird auf aktivierten T-Zellen, vor allem zytotoxischen CD8⁺-T-Killerzellen aber auch NK-Zellen exprimiert (Malarkannan, 2020; Nagata & Golstein, 1995; Rink et al., 2018). Nach Bindung an den Fas-Rezeptor (FasR, CD95) wird dieser trimerisiert und über die extrinsische Signalkaskade wird die Apoptose ausgelöst (Heinrich et al., 2014; Rink et al., 2018). Ebenso kann an den Fas-Rezeptor der Tumornekrosefaktor (TNF) binden. Der Apoptoserezeptor FasR wird auf Immunzellen und auch auf Zellen anderer Gewebe konstitutiv exprimiert (Malarkannan, 2020). So können autoreaktive T-Zellen, aber auch neoplastische Zellen eliminiert werden (Sharma et al., 2000). Auch beim Beenden der allgemeinen Immunreaktion ist Fas/FasL beteiligt. Wenn T-Zellen sowohl den FasR als auch den FasL auf ihrer Oberfläche tragen und nach erfolgreicher Immunantwort kaum noch Zielzellen zur Verfügung stehen, interagieren die T-Zellen irgendwann untereinander und führen zum gegenseitigen Tod (Hof et al., 2017). Fas-Ligand ist neben Perforin, Granzyme und TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) Teil der wichtigsten zytotoxischen Granula-Proteine der Natürlichen Killerzellen, die bei deren Aktivierung sezerniert werden (Rink et al., 2018). Kommt es zu einer Entzündung, kann die FasL-Expression induziert und auch verstärkt werden. Es scheint somit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems zu spielen (Rink et al., 2018). Neben der membrangebundenen Form (mFasL), von der im Allgemeinen gesprochen wird, existiert auch eine lösliche Form (sFasL, soluble), die durch proteolytische Spaltung der membrangebundenen Form entsteht (Heinrich et al., 2014; Schneider et al., 1998). Während das mFasL für die Apoptoseinduktion zuständig ist, scheint das sFasL die Tumorentstehung durch nicht-apoptotische Aktivitäten zu fördern. So leiden Mäuse, die lediglich sFasL, exprimieren, an ausgedehnten Lebersarkomen (O' Reilly et al., 2009).

Mutationen im FAS-Gen können zu einer Autoimmunerkrankung führen, die als lymphoproliferatives Autoimmunsyndrom (ALPS) bezeichnet wird. Durch den defekten Fas-Rezeptor kommt es zu einer gestörten Apoptose und zur Anhäufung vieler Lymphozyten. Klinisch führt dies zu einer generalisierten und massiven Lymphknotenschwellung, zu einer Hepato- und Splenomegalie, was sich schon im zehnten Lebensmonat manifestieren kann (Nagata & Golstein, 1995; Rink et al., 2018).

2. Einleitung

2.2.3.4 FoxP3

FoxP3 steht für forkhead box P3 und ist ein im Zellkern lokalisierter charakteristischer Transkriptionsfaktor für natürliche und induzierte CD4⁺-T^{REG}-Zellen (nT^{REG} und iT^{REG}) (siehe zelluläre Komponente des humanen Immunsystems) (Kim, 2009; Rink et al., 2018). FoxP3 wird sehr stark von den regulatorischen T-Zellen exprimiert und ist deswegen ihr wichtigster Marker (Heinrich et al., 2014; Sakaguchi et al., 2010). Als Transkriptionsfaktor kann FoxP3 an DNA binden und die Expression bestimmter Gene beeinflussen (Kim, 2009). So steigert es nicht nur die Synthese der von den T^{REG} benötigten Proteinen sondern dient auch der Neubildung dieser T-Zellen selbst (Kasprowicz et al., 2003). Die natürlichen T^{REG} entstehen in den Hassal'schen Körperchen des Thymus, während sie unter dem Einfluss von TSLP (thymic stromal-derived-Imphopoietin) stehen. Sie sind wichtig für die Selbsttoleranz des Immunsystems, während die induzierten T^{REG}, die im Laufe einer Immunreaktion entstehen, diese vor allem regulieren (Rink et al., 2018). Trotz allem ist FoxP3 nicht der exklusive Transkriptionsfaktor für T^{REG} und auch nicht alle Subpopulationen der T^{REG}. Beispielsweise exprimieren auch TR1 Zellen (Type 1 regulatory t-cells) als Sondergruppe der iT^{REG} ebenfalls FoxP3. Die Hauptaufgabe der regulatorischen T-Zellen und somit von FoxP3 ist die immunsuppressive Wirkung und die Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion, indem sie TH1- und TH2-Zellen durch die Sekretion von TGFβ supprimieren (näheres im Kapitel der zellulären Komponenten des Immunsystems) (Lafaille & Lafaille, 2009; Rink et al., 2018). Bei Krebspatienten wird davon ausgegangen, dass FoxP3 exprimierende T^{REG}-Zellen zur immunsuppressiven Mikroumgebung des Tumors beitragen (Jung et al., 2017). Kommt es zum Defekt von FoxP3, kann es zum XLAAD (X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome) kommen. Darunter treten schon früh lebensbedrohliche autoimmune und auch allergische Reaktionen sowie Diarrhoe, Diabetes mellitus Typ 1, hämolytische Anämien und weitere zum Teil unspezifische Symptome auf (Rink et al., 2018).

2.2.3.5 IL10

Interleukin-10 gehört zur Familie der Interleukine und ist ein Zytokin. Wie oben bereits beschrieben können sich CD4⁺-T-Zellen zu vier verschiedenen T-Effektorzellen differenzieren. Zu diesen gehören die TH1-Zellen, TH2-Zellen, TH17-Zellen und T^{REG}-Zellen. Neben der hauptsächlichen Sezernierung von IL10 durch Monozyten und dendritische Zellen ist die Produktion vor allem für TH2- und für natürliche sowie induzierte T^{REG}-Zellen charakteristisch (Rink et al., 2018). Die Bildung des Zytokins verhindert eine TH1-Antwort und lenkt so den Schwerpunkt der Antwort zu den TH2-Zellen (Hof et al., 2017). Gleichzeitig wird die Bildung der TH2-Zellen durch IL10 induziert. TH2-Zellen sezernieren neben IL10 auch TGFβ, wobei beide über das Supprimieren der TH1-Zellen eine antiinflammatorische Wirkung haben. Hierfür bindet IL10 an seinen zugehörigen Rezeptor auf Makrophagen, die

anschließend ihre stimulierende Wirkung auf TH1-Zellen reduzieren. IL10 wirkt auf diese Weise eher indirekt. Auch die Produktion von IL10 durch T^{REG}- und TR1-Zellen betont die antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung. TR1-Zellen, als Sondergruppe der iT^{REG}, entstehen unter dem Einfluss von IL10. Sie hemmen über die IL10 Produktion die TH1- und TH17-Zellen. Allgemein können T^{REG}-Zellen über IL10 und TGF β neben den TH1- auch die TH-2 Zellen hemmen (Abb. 2). Auch die Proliferation und zytotoxische Wirkung von CD8⁺-T-Zellen werden durch IL10 gefördert, indem es das IL2 während der Differenzierung ersetzt (Chen & Zlotnik, 1991; MacNeil et al., 1990). Reguliert wird IL10 außerdem vom ICOS (inducible costimulatory molecule), ein Antigen, das nach ein bis zwei Tagen auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Rink et al., 2018). Als Zytokin der T-Helferzellen initiiert es außerdem die Vermehrung und die Differenzierung der B-Lymphozyten und ist beim Immunglobulin-Klassen-Switch und bei der Plasmazelldifferenzierung beteiligt (Rink et al., 2018). Da TH2-Zellen eine entscheidende Rolle bei Typ-I-Allergien spielen, spricht man IL10 die allergenspezifische Bildung von IgE, die Aktivierung eosinophiler Granulozyten und die Degranulierung von Mastzellen zu (Rink et al., 2018). IL10 kann negativ rückgekoppelt aktivierte Makrophagen hemmen, indem diese das Interleukin selbst sezerniert haben. Dadurch hemmt es gleichzeitig auch die Synthese von IFN γ , IL1, IL2, IL6, TNF α und GM-CS durch Makrophagen und T-Helferzellen. Des Weiteren werden die Monozyten statt zur Antigenpräsentation eher zur Phagozytose gedrängt, wodurch sie eher zu Makrophagen als zu antigenpräsentierenden, proinflammatorischen dendritischen Zellen differenzieren (Ng et al., 2013). Auch in der Immunerontologie spielt IL10 eine Rolle. Alte Menschen produzieren vermehrt TH2-Zytokine, wie IL10, statt dem von den TH1-Zellen sezernierten IFN γ . Somit dominiert die TH2-Immunantwort und es kommt zu einer Langlebigkeit von B-Zellen, während die verminderte IFN γ -Produktion in vermehrten viralen und bakteriellen Infektionen resultiert (Rink et al., 2018).

2. Einleitung

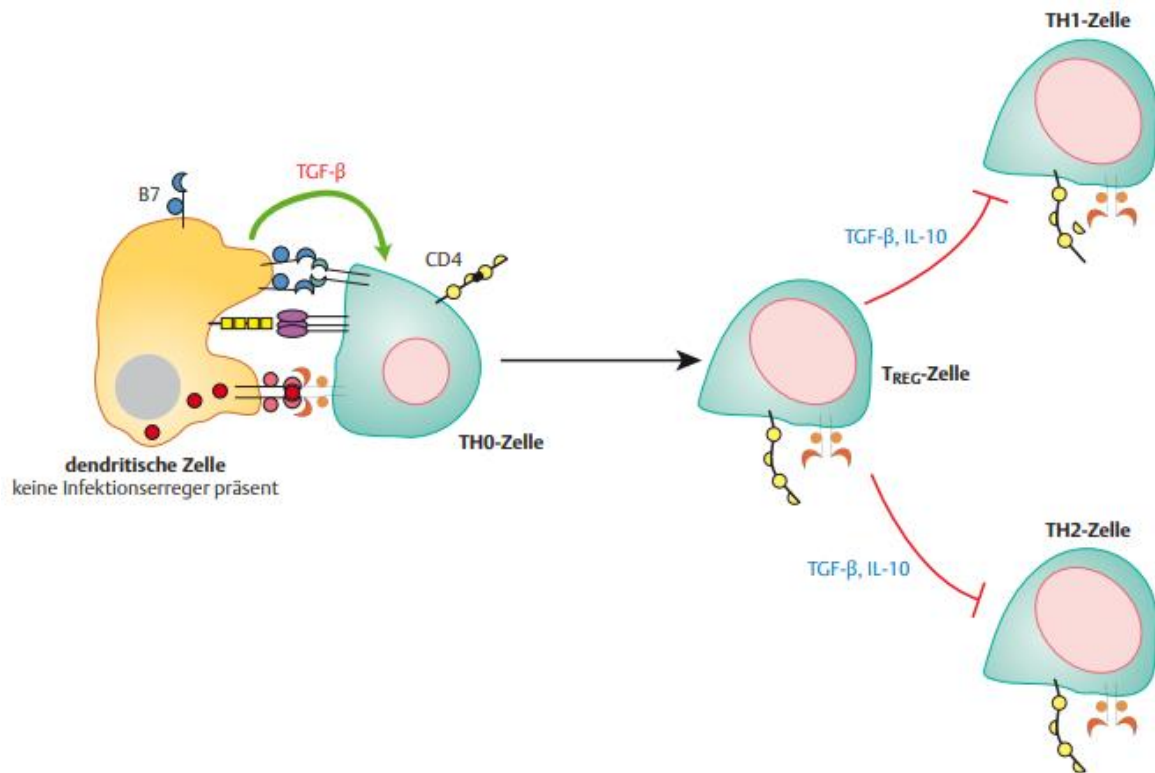


Abbildung 2: Induktion von T^{REG}-Zellen und Wirkung auf weitere CD4⁺-T-Zellen. Im linken Teil der Abbildung ist dargestellt, wie eine dendritische Zelle einer CD4⁺-T-Zelle Peptide präsentiert, gegen die keine Immunantwort ausgelöst werden soll, da sie beispielsweise körpereigen sind. Die TH0-Zelle wird so zur T^{REG}-Zelle. Diese wiederum supprimiert eine Immunantwort, indem sie unter anderem IL10 sezerniert, welches hemmend auf TH1- und TH2- Zellen wirkt. Abbildung modifiziert nach Hof et al. 2017 (Hof et al., 2017).

2.3 Vitamin-D und das Immunsystem

Wie in den vorherigen Kapiteln dieser Arbeit bereits erörtert, spielt das Immunsystem mit seiner antitumoralen Aktivität eine wichtige Rolle in neuen Konzepten onkologischer Therapien (Ferris, 2015; Kansy et al., 2015; Mandal et al., 2016). Auf diese Weise wird deutlich, dass supportiv auf das Immunsystem wirkende Mediatoren zur Tumorthherapie beitragen können und allgemein immunonkologische Forschungen weiterhin ausgebaut werden sollten.

Vitamin-D, mit seiner bewiesenen immunregulatorischen und antitumoralen Wirkung, könnte in dieser Hinsicht von starkem Interesse für zukünftige innovative Therapieansätze und die Steigerung der Effektivität immunonkologischer Therapien sein (Anderson et al., 2010; Baeke et al., 2010; Guyton et al., 2001; Mora et al., 2008; Prietl et al., 2013; Tretli et al., 2012). Darüber hinaus wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine Vitamin-D-Supplementierung als supportive Therapie das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten verlängert (Anand et al., 2013; Bochen et al., 2018; Fathi et al., 2019; Gugatschka et al.,

2011). Dies legt alles in allem die Sinnhaftigkeit einer näheren Untersuchung dieses Vitamins im Kontext der Kopf-Hals-Onkologie im Rahmen der vorgelegten Dissertation nahe.

2.4 Vitamin-D

2.4.1 Physiologie des Vitamin-D

Vitamin-D ist ein fettlösliches Vitamin, das im Körper nicht nur als Hormon sondern auch als Zytokin des Immunsystems fungiert (Adams & Hewison, 2010). Neben Vitamin-D₃ (Cholecalciferol), das der Körper selbst synthetisieren kann, gibt es Vitamin-D₂ (Ergocalciferol), das vorwiegend über pflanzliche Nahrung oder Vitaminpräparate zugeführt wird (Heinrich et al., 2014). Beide Formen müssen jedoch erst aktiviert werden, um entsprechende Effekte im Körper zu erzielen. Natürliche Quellen sind vor allem fettiger, wild gefangener Fisch (Lachs, Hering, Makrele) und Fischöle (Lebertran) (Holick & Chen, 2008; Rink et al., 2018). Auch sonnenexponierte oder sonnengetrocknete Pilze enthalten Vitamin-D, jedoch liefern sie nur Ergocalciferol, während Fisch das leichter vom Darm resorbierbare Cholecalciferol bereitstellt (HOLICK, 1985). In Rind- und Schweinefleisch ist Vitamin-D als 25-Hydroxycholecalciferol enthalten (Holick, 2017).

Vitamin-D ist das einzige Vitamin, das der Organismus komplett selbst herstellen kann. Eine wichtige Rolle im Synthese- und Aktivierungsweg des Vitamin-D spielt dabei die Leber. Dort wird im ersten Schritt der Vitamin-D-Synthese aus Cholesterin mithilfe der Cholesterin-Dehydrogenase das Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) hergestellt. Dieses wird in der Haut gespeichert und von UVB-Strahlen gespalten, sodass Cholecalciferol entsteht (Bouillon et al., 2008; Heinrich et al., 2014). Hieraus erklärt sich die Minderung der Vitamin-D Synthese durch aufgetragenen Sonnenschutz, da dieser UV- filternd wirkt. Menschen mit starker Hautpigmentierung können durch die UV-absorbierende Wirkung von Melanin ebenfalls nur erschwert Vitamin-D bilden (Adams & Hewison, 2010). Cholecalciferol muss nun in zwei weiteren Schritten aktiviert werden, bevor es seine natürlichen Funktionen ausüben kann. In der Leber wird es durch die 1 α -Hydroxylase hydroxyliert und es entsteht Calcidiol (25-Hydroxycholecalciferol). Im nächsten Schritt wird es in der Niere erneut hydroxyliert, sodass Calcitriol entsteht (1,25-Dihydroxycholecalciferol) (Bouillon et al., 2008; Heinrich et al., 2014). Dies ist die stabilste Form aller Vitamin-D-Metabolite (Adams & Hewison, 2010). Die Stabilität ergibt sich durch die starke Bindung an sein Transportprotein. Hierfür dient das Vitamin-D-bindende Protein (DBP), das es zwischen den Organen aber auch zu seinen Zielzellen befördert (Fathi et al., 2019). Gespeichert wird es vornehmlich im Fettgewebe als 25-Hydroxycholecalciferol, um über die Galle ausgeschieden zu werden.

2.4.2 Funktion des Vitamin-D

Die Hauptfunktion des Vitamin-D liegt in der Beeinflussung des Calcium- und Phosphatstoffwechsels (Bouillon et al., 2008). Sowohl im Darm als auch in der Niere fördert es deren Resorption, wobei die Calciumresorption im Darm über vermehrte Bildung des Calciumtransportproteins Calbindin vermittelt wird (Adams & Hewison, 2010; Heinrich et al., 2014). Sobald die intestinale Calcium Absorption sinkt, detektiert ein Calcium-Rezeptor in der Nebenschilddrüse die verminderte Serum-Calcium-Konzentration und es kommt zur Parathormon Freisetzung (Prietl et al., 2013). Dieses interagiert mit dem Parathormon-Rezeptor (PTH/PTHrP) im proximal tubulären Nierenepithel, sodass die Genexpression der 1 α -Hydroxylase gesteigert wird (Heinrich et al., 2014). Gleichzeitig kann dieser Schritt auch gehemmt werden, wofür der Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) zuständig ist (Heinrich et al., 2014). Auf der anderen Seite kommt es bei Hypocalzämie über die Aktivierung von Osteoklasten zur Mobilisierung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen. Eine zweite Funktion von Vitamin-D ist die Förderung des Knochenauf- und -umbaus sowie die Mineralisierung des Knochens (Prietl et al., 2013). Dies gelingt zum einen indirekt, durch Aufrechterhaltung des Calcium- und Phosphatspiegels und zum anderen direkt, durch Förderung der Osteoklastendifferenzierung und Aktivierung von Osteoblasten (Heinrich et al., 2014). Eine weitere Funktion kann man Vitamin-D im Beeinflussen der Genexpression zuschreiben. Der Vitamin-D-Rezeptor entspricht gleichzeitig einem intranukleären Transkriptionsfaktor, an den mit hoher Affinität Calcitriol binden kann. Er wird in den meisten Zelltypen exprimiert. So kommt er auch auf B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, Kolonkarzinomzellen und Hepatozyten vor (Carlberg, 2014). Der VDR (Vitamin-D-Rezeptor) bindet an sogenannte Vitamin-D-Response-Elements (VDRE) die im Promotor vieler Gene liegen und so durch Vitamin-D reguliert werden (Bouillon et al., 2008). So kann Vitamin-D die Differenzierung von Immunzellen modulieren und genexpressionsregulierende Wirkungen entfalten (Carlberg, 2014; Heinrich et al., 2014).

2.4.3 Bestimmung des Vitamin-D-Status

Mit Hilfe der Vitamin-D-Serumspiegelbestimmung kann ein Vitamin-D-Mangel von einer Vitamin-D-Intoxikation oder einer normwertigen Vitamin-D-Versorgung unterschieden werden. Wie oben bereits erwähnt kann der Körper Vitamin-D in Form von Calcidiol (25-Hydroxyvitamin-D) speichern, weswegen sich diese einfach hydroxylierte Form zur Bestimmung der allgemeinen Vitamin-D-Versorgung des menschlichen Organismus eignet. Zusätzlich besitzt Calcidiol eine Halbwertszeit von 2-3 Wochen, während sie bei Calcitriol bei nur 4-6 Stunden liegt (Dusso et al., 2005; Heaney, 2012). Aktives Vitamin-D₃ kann zudem durch größere Spiegelschwankungen einen Vitamin-D-Mangel maskieren, indem es in solchen Fällen meist erhöht ist. Dies geschieht dadurch, dass ein Mangel an Vitamin-D in

einer verringerten Calcium-Resorption im Darm resultiert, woraufhin der Calcium-Spiegel im Blut sinkt, die Parathormonproduktion steigt und in der Niere die Umwandlung von Calcidiol zu Calcitriol gefördert wird. Der Vorteil einer Bestimmung des aktiven Vitamin-D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol) ist somit eher die Detektion von Stoffwechselstörungen innerhalb der Vitamin-D-Synthese (Prietl et al., 2013).

2.4.4 Vitamin-D-Mangel, Dosierung und Intoxikation

Weltweit sind mehr als eine Milliarde Kinder und Erwachsene von einem Vitamin-D-Mangel betroffen (Holick & Chen, 2008). Von einem Mangel spricht man ab einem 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel von unter 20 ng/ml (50 nml/L), Werte von 21-29 ng/ml weisen auf eine unzureichende Versorgung hin (Heaney et al., 2003; Prietl et al., 2013). Immer wieder gibt es auch beim internationalen Vergleich der entsprechenden Leitlinien Diskussionen um die Definition des Vitamin-D-Mangels, beispielsweise ob von diesem erst ab 30 ng/ml gesprochen werden könnte. Festzuhalten ist, dass sich ein Mangel ab einem Spiegel von unter 10 ng/ml klinisch, in Form einer schmerzhaften Knochenerweichung, Muskelschwäche und pathologischen Frakturen als Teil des Krankheitsbildes der Osteomalazie manifestiert (Holick, 2017; Holick & Chen, 2008; Van Schoor & Lips, 2011).

Die Gründe für einen Vitamin-D-Mangel können sehr vielfältig sein und haben ihren Ursprung häufig in einer Störung in einem der Schritte der Vitamin-D-Synthese. Die geringere UV-Strahlung im Winter spielt ebenso eine wichtige Rolle wie Sonnenschutz und pigmentierte Haut. Bereits ein Lichtschutzfaktor von 15 verringert die Synthese von Vitamin-D₃ um 99% (Matsuoka et al., 1987). Afroamerikaner haben durch ihre Hautpigmentierung einen intrinsischen UVB-Schutz, weswegen bei ihnen dauerhaft die Vitamin-D-Synthese um 99% reduziert ist (Holick & Chen, 2008). Mehr als 90% der dunkelhäutigen Menschen in den USA und 75% der Weißen leiden unter einem Vitamin-D-Mangel (Adams & Hewison, 2010). Letztendlich ist der Hauttyp, ähnlich zur Hautfarbe, ein Marker welche Dauer an Sonnenexposition die Haut zur Vitamin-D-Produktion benötigt. So braucht eine Person des Hauttyps VI eine mindestens 5-10-mal längere Sonnenexposition als eine Person des Hauttyps II (Holick, 2017). Auch im Alter entstehen gehäuft Vitamin-D-Mangelzustände. 70-jährige weisen nur noch 25% des 7-Dehydrocholesterins eines jungen Erwachsenen auf. Nachgewiesen ist außerdem ein Vitamin-D-Mangel verbunden mit Adipositas, da das Vitamin-D als fettlösliches Vitamin direkt durch den großen Körperfett-Pool absorbiert wird und dann nicht mehr bioverfügbar ist. Medikamente, beispielsweise Glucocorticoide oder Antikonvulsiva, wurden ebenfalls mit einem Mangel assoziiert (Holick & Chen, 2008; Rink et al., 2018). Auf der anderen Seite können eine Mangelernährung und auch Resorptionsstörungen wie zum Beispiel bei einer CED (chronisch entzündliche Darmerkrankung) zur Hypovitaminose-D führen. Nicht zu vergessen sind auch die

2. Einleitung

Hydroxylierungsstörungen infolge einer akuten oder chronischen Leber- oder Niereninsuffizienz, die außerdem sekundär zu einem Hyperparathyroidismus führen können (Heinrich et al., 2014).

In der Situation eines nachgewiesenen Vitamin-D-Mangels ist ein Spiegel des Calcidiols von mindestens 30 ng/ml, besser jedoch von 40-60 ng/ml als therapeutisches Ziel anzustreben. Dieser Zielwert beruht auf Beobachtungen der Regulation von PTH. Das PTH sinkt stetig bis zu einem Serum-Calcium-Spiegel von 30-40 ng/ml. Hier erreicht es seinen Tiefpunkt und erst ab dieser Grenze wird der Körper aktiv. Ebenso ist bei postmenopausalen Frauen die intestinale Calciumabsorption auf 32ng/ml beschränkt. Erst ab einem Level von 30 ng/ml stellen sich positive Wirkungen ein (Holick & Chen, 2008). Genau wie bei den Unstimmigkeiten ab wann man von einem Vitamin-D-Mangel spricht, ist man sich auch bei der optimalen Dosierung von Vitamin-D in der Substitution uneinig. Gemäß der Internationalen Endokrinologischen Gesellschaft liegt die optimale tägliche Vitamin-D₃-Dosis für Erwachsene bei 10.000 IE. Das Medizinische Institut der USA empfiehlt eine niedrigere Dosis von 4.000 IE/Tag. Die Europäische Behörde für Lebensmittel plädiert wiederum für eine Dosis unterhalb dieser 4.000 IE/Tag (Battault et al., 2013; Holick, 2017; Holick et al., 2011; Prietl et al., 2013). Im Winter, sowie bei Fett-Malabsorption, nach Magenbypassoperation und Adipositas ist die Absorption vermindert und die Dosen müssen deutlich erhöht werden. Menschen mit einem BMI >30 brauchen nachgewiesenermaßen 2-3-mal mehr Vitamin-D, um eine Mangelsituation zu verhindern (Holick, 2017; Holick & Chen, 2008). Diese Hintergründe machen deutlich, dass eine Vitamin-D-Substitution immer unter Kontrolle des Serum-25-OH-Vitamin-D-Spiegels erfolgen sollte, um die individuell geeignete Dosierung ermitteln zu können.

Eine Intoxikation durch Überdosierung mit Vitamin-D ist sehr selten und tritt erst ab einem Serum-Spiegel von 150 ng/ml ein. Eine Hypervitaminose durch zu viel Sonneneinstrahlung ist durch die chemische Instabilität des Vitamin-D unmöglich. Die meisten Intoxikationen entstehen durch Einnahmefehler, und können in verschiedenen Krankheitszuständen wie beispielsweise einer Nephrokalzinose resultieren (Heinrich et al., 2014; Vieth, 2007; Zittermann et al., 2013).

2.4.5 Vitamin-D und sein Einfluss auf Tumorerkrankungen und das Immunsystem

Bereits in den 1980er und 1990er Jahren deuteten mehrere Beobachtungen darauf hin, dass das Leben in höheren Breitengraden mit geringerer Sonnenexposition das Risiko erhöht, an verschiedenen Krebsarten zu erkranken und zu sterben. Da das Leben in höheren Breitengraden die Vitamin-D-Synthese verringert, ging man von einem Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Mangel und Krebsmortalität aus (Bouillon et al., 2008; Holick & Chen,

2008). So sorgt ein ausreichender Vitamin-D-Spiegel für eine bessere Prognose als auch für ein verlängertes Gesamtüberleben von Tumorpatienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten (Bochen et al., 2018; Gugatschka et al., 2011). Vitamin-D soll in nicht-calciumregulierenden Geweben wie Dickdarm, Prostata oder Blut, für die Regulation von bis zu 200 Genen verantwortlich sein. Diese beeinflussen die Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung und sind möglicherweise für die Verringerung des Transformationsrisikos der Zellen in einen malignen Zustand verantwortlich (Holick & Chen, 2008). Kolorektale Karzinome und Brustkrebs stehen so in engem Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Serumspiegel (Anderson et al., 2010; Tretli et al., 2012). Patienten mit einem Vitamin-D-Spiegel unter 30 ng/ml, sollen ein doppelt so hohes Risiko haben an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Gleichzeitig haben an Brustkrebs erkrankte Frauen afroamerikanischen Ursprungs eine um 29% höhere Mortalitätsrate (Garland et al., 2006). Darüber hinaus zeigten sich in Untersuchungen der vergangenen Jahre auch signifikante Effekte von Vitamin-D auf die Epidemiologie und den klinischen Verlauf von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC). Auch hier resultiert eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung in einem geringeren Erkrankungsrisiko, einer besseren Prognose und einem längeren Überleben (Fathi et al., 2019; Gugatschka et al., 2011; Orell-Kotikangas et al., 2012). Die HNO-Klinik des Universitätsklinikum des Saarlandes stellte in diese Richtung ebenfalls Nachforschungen an. Hierbei ergab sich eine höhere Inzidenz eines Vitamin-D-Mangels bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Tumorerkrankung. Die Patienten der Kontrollgruppe wiesen dabei einen durchschnittlichen Vitamin-D-Spiegel (25-OH-Vitamin-D) von 23,7 ng/ml auf (Abb. 3B), während dieser bei den Patienten mit Kopf-Hals-Tumor bei 14,1 ng/ml lag (Abb. 3A). Die statistische Auswertung unterstrich diesen Unterschied, mit einem hochsignifikanten Ergebnis (Abb. 3C). Auch die Betrachtung der Lymphknotenmetastasen stützte die bisherigen Daten, indem bei den ausreichend mit Vitamin-D versorgten Patienten signifikant weniger Lymphknoten von Metastasen befallen waren (Abb. 3D) (Bochen et al., 2018).

2. Einleitung

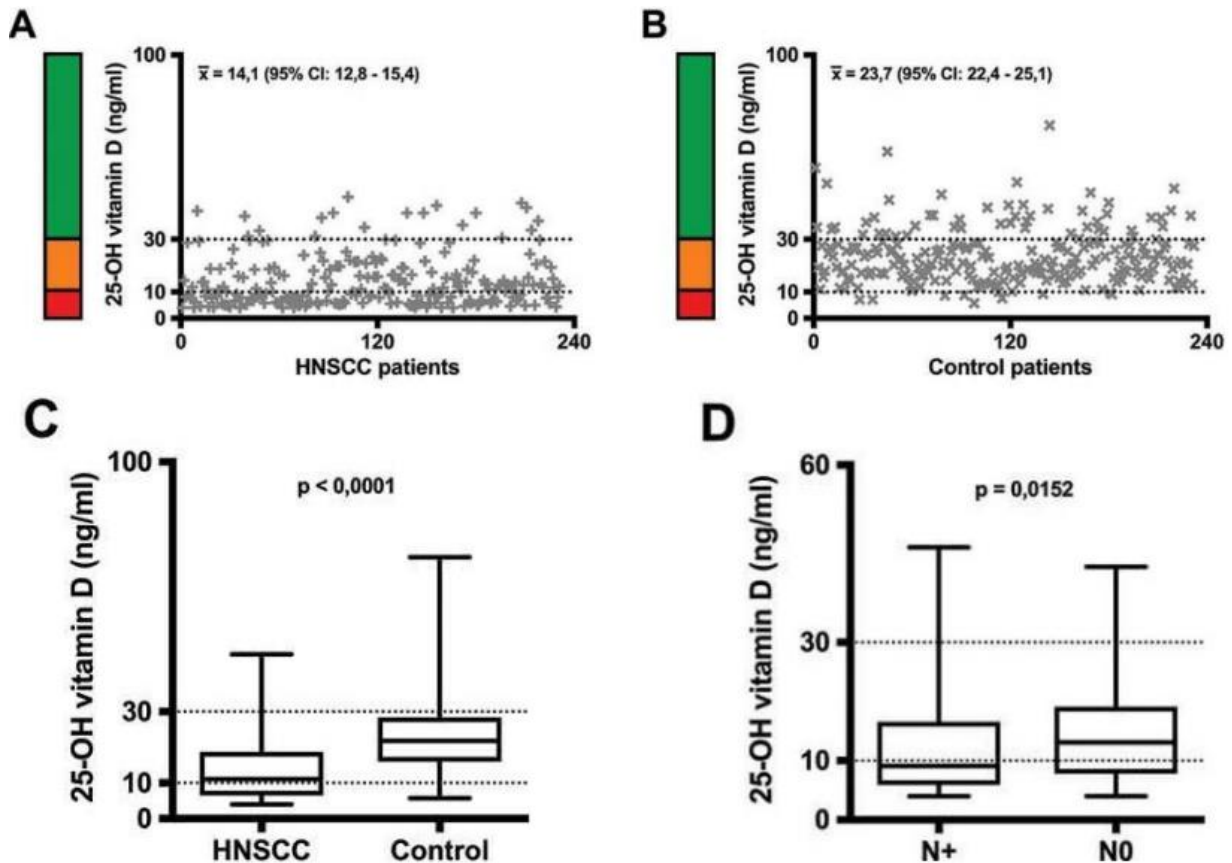


Abbildung 3: Dargestellt ist der durchschnittliche 25-OH-Vitamin-D-Spiegel eines Kollektivs mit und ohne Kopf-Hals-Tumoren sowie dessen Einfluss auf die Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren und das Auftreten von befallenen Lymphknoten. Bild A zeigt den durchschnittlichen Vitamin-D-Serumspiegel der HNSCC-Patienten ($\bar{x} = 14,1$) und Bild B den der Kontrollpatienten ($\bar{x} = 23,7$). Bild C stellt die Daten der Bilder A und B in einem Boxplot gegenüber und resultiert in einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,0001$). Bild D bildet mit einer statistischen Signifikanz von $p = 0,0152$ die vom Vitamin-D-Serumspiegel abhängigen Unterschiede in der Anzahl der befallenen Lymphknoten mithilfe von Boxplots ab. Abbildung modifiziert nach Bochen et al. 2018 (Bochen et al., 2018).

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen werden Vitamin-D weitere Funktionen in der antitumoralen Immunabwehr zugesprochen. So kann Calcitriol über zellspezifische Mechanismen die Apoptose von Zielzellen, wie Tumorzellen induzieren, indem es die Expression von pro-apoptotischen Proteasen wie Caspasen fördert und die vor Apoptose schützenden Proteine wie Bcl-X herunterreguliert (Blutt et al., 2000; Fathi et al., 2019). Weiterhin scheint Vitamin-D antiproliferative Effekte zu besitzen, die es im Rahmen seiner antitumoralen Aktivität ausübt. So hemmt es hohe Telomerase-Aktivitäten, führt zur Hochregulierung der Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und steigert die Expression von Wachstumsinhibitoren (Diaz-Padilla et al., 2009; Welsh, 2012). Hinzu kommen antiinflammatorische Effekte, beispielsweise über die Hemmung der Prostaglandin-Synthese, die wichtige Entzündungsmediatoren in tumoralen Geschehen darstellen (Mantovani et al., 2008; Moreno

et al., 2005). Eine weitere Fähigkeit des Vitamin-D bildet sich in der stimulierenden Wirkung zur Differenzierung ab, sodass sich neoplastische Zellen zu einem nahezu normalen, reifen Phänotyp umwandeln können. Dies wurde besonders bei Versuchen an Kolonkarzinomzellen beobachtet (Fathi et al., 2019; Gocek & Studzinski, 2009). Inhibitorische Effekte im Rahmen seiner antitumoralen Wirkung übt Vitamin-D in Hinblick auf die Angiogenese und Metastasierung aus. Durch Hemmung der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), durch die Verringerung von Prostaglandin-E2 und durch direkte Hemmung der Proliferation von Endothelzellen führt es zur verminderten Gefäßneubildung, auf die Tumoren in großem Ausmaß angewiesen sind (Ben-Shoshan et al., 2007; Chung et al., 2009; Fukuda et al., 2003).

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in mehreren Studien ein großer Einfluss von Vitamin-D auf das Immunsystem beobachtet werden (Baeke et al., 2010; Bouillon et al., 2008; Kongsbak et al., 2014; Mora et al., 2008; Prietl et al., 2013). Ihm wird eine immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben, die der eines Zytokins ähnelt (Adams & Hewison, 2010; Hewison et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass Vitamin-D einen weitaus größeren Einfluss auf die Gesundheit hat als bisher angenommen. So konnte an einem Kollektiv von HNSCC-Patienten gezeigt werden, dass bei hohem Vitamin-D-Spiegel eine deutlich höhere Infiltration von CD3⁺-T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen des Tumormikromilieus beobachtet werden kann (Bochen et al., 2018). Makrophagen und dendritische Zellen können Calcitriol synthetisieren, gleichzeitig wird jedoch die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen aus myeloischen Vorläuferzellen durch Calcitriol induziert, sodass ein Mangel auf Dauer die Makrophagen-Differenzierung beeinflusst (Rink et al., 2018). Der VDR lässt sich auf Makrophagen, Lymphozyten aber auch auf dendritischen Zellen finden. Indem Calcitriol dendritische Zellen in einen unreifen, tolerogenen Zustand versetzt, exprimieren diese weniger MHC-II-Moleküle. Dies führt zu einer geringeren Antigenpräsentation und IL12 Sekretion, dafür zu einer erhöhten Produktion des tolerogenen IL10. IL10 induziert wiederum T^{REG}-Zellen, die zur Kontrolle der Immunantwort und zur Entscheidung über die Entwicklung von Autoreaktivität befähigt sind (Adorini et al., 2003; Baeke et al., 2010; Mora et al., 2008; Rink et al., 2018). Außerdem wirkt Calcitriol antiproliferativ auf TH-Zellen und deren Differenzierung und supprimiert die Bildung von TH17- und TH1-Zytokinen (Lemire et al., 1984). Insgesamt wird die Produktion entzündungshemmender TH2-Zytokine wie IL10 gefördert und die Sekretion proinflammatorischer TH1- und TH17-Zytokine wie IFN γ , TNF α und IL17 gehemmt (Boonstra et al., 2001; Cantorna, 2010; Joshi et al., 2011; Prietl et al., 2013). Die TH2-Zellen beeinflusst Calcitriol ambivalent, indem es je nach Sekretions-Zeitpunkt deren Wirkung steigert oder unterdrückt. Es wirkt zum einen indirekt, über die TH-Zellen-Supprimierung (Lemire et al., 1984), aber auch direkt über die Hemmung der Differenzierung und

2. Einleitung

Proliferation von B-Zellen. Calcitriol unterdrückt auf diese Weise deren Differenzierung zu Plasmazellen und die Produktion von Immunglobulinen (Baeke et al., 2010; Mora et al., 2008; Rink et al., 2018). Durch die Kontrolle der B-Zell-Aktivierung kann Vitamin-D Autoimmunkrankheiten regulieren, bei denen die autoreaktiven Antikörper der B-Zellen eine große Rolle spielen. Calcitriol kann außerdem die Chemotaxis und die phagozytierenden Fähigkeiten angeborener Immunzellen verstärken (Baeke et al., 2010) und aktiviert über einen Komplex mit dem Vitamin-D- und Retinoid-X-Rezeptor die Transkription antimikrobieller Peptide, wie zum Beispiel Defensin- β 2 und Cathelicidin (Gombart et al., 2005; T.-T. Wang et al., 2004). Wenn Erreger über die von ihnen abgestoßenen PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) den TLR-Signalweg (Toll-like-Rezeptor) aktivieren, führt dies zur verstärkten Expression des VDR-Gens und des 1α -Hydroxylase Gens. Auch andere Zytokine wie IFN γ und IL4 steigern die 1α -Hydroxylase Expression. Hier wird zusätzlich vermehrt Cathelicidin gebildet, das reaktiv auf virale, bakterielle und durch Pilze verursachte Infektionen hochreguliert wird und zur Destabilisierung mikrobieller Membranen führt (Adams & Hewison, 2010; Ramanathan et al., 2002).

Die Immunreaktion gegen Tumoren, bei denen die Immunzellen entartete Zellen als solche erkennen müssen, scheint ebenfalls von Vitamin-D beeinflussbar zu sein (Bochen et al., 2018; Walker et al., 2012). Tumoren besitzen Mechanismen, durch die sie der Immunabwehr entgehen. Das Interagieren zwischen Tumor und Immunsystem wird dabei als Immun-Editing bezeichnet und ist der Grund, warum meist schon eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor besteht, bevor sich dieser klinisch manifestiert (Rink et al., 2018). CD8⁺-T-Lymphozyten erkennen über MHC-Klasse-I-Moleküle ihre Zielzellen, die sie dann lysieren. Ein Beispiel, wie Tumorzellen versuchen sich dem Zugriff des adaptiven Immunsystems zu entziehen, ist die zelluläre Down-Regulation von MHC-I-Molekülen (Rink et al., 2018). Hinzu kommt die tumorale Produktion von Zytokinen wie IL10. Dieses wirkt unter anderem antiinflammatorisch und sorgt für eine tolerogene Präsentation der Tumorzellen und löst Toleranz in T-Zellen aus (Rink et al., 2018). Um einer Immunantwort aktiv zu entgehen, exprimieren Tumorzellen auf ihrer Oberfläche zudem FasL (siehe weiter oben). T-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche Fas exprimieren, werden so durch die Fas/FasL Interaktionen in die Apoptose getrieben (Rink et al., 2018). Besonders auch Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, zeichnen sich durch eine immunsuppressives Tumor-Mikromilieu aus. Sie verhindern die regelrechte NK-Zell-Funktion, vermindern die Aktivität tumorinfiltrierender Leukozyten und verursachen eine defekte Ausreifung dendritischer Zellen (Dasgupta et al., 2005; Mandal et al., 2016)

Zusammenfassend sind immunmodulatorische und antitumorale Eigenschaften des Vitamin-D mit zunehmender Evidenz in den zurückliegenden Jahren nachgewiesen worden. Da gerade HNSCC-Tumoren ausgeprägte Mechanismen der Immunevasion zeigen, aber

dennoch zu den am stärksten immuninfiltrierten Tumoren zählen (Mandal et al., 2016), könnte die Einnahme von Vitamin-D ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der immunonkologischen Behandlung von HNSCCs darstellen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Seit Jahrzehnten sind die therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren auf die chirurgische Resektion, eine Chemo- und Strahlentherapie begrenzt. Die Prognose von HNSCC-Patienten ist weiterhin ungünstig und die Überlebensraten sind gering. Dies konnte selbst durch die wenigen Fortschritte in der zielgerichteten Therapie von HNSCCs wie die Zulassung des Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab im Jahr 2006 nur in geringem Maße geändert werden. Hinzu kam eine gesteigerte therapeutische Langzeit-Toxizität und eine Akkumulation von Nebenwirkungen (Schmoll, 2020). Das hohe Potential von immunonkologischen Therapieansätzen wurde von den neu zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab für die rezidierte und metastasierte Therapiesituation aufgezeigt, letztendlich profitiert von dieser Therapie jedoch nur ein geringer Anteil der behandelten Patienten und langfristige Therapieerfolge bleiben noch abzuwarten (Wollenberg, 2019). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass dringend neue Therapiekonzepte benötigt werden, die die Prognose der Patienten verbessern, die Überlebensraten steigern, Rezidive reduzieren und parallel ein günstiges Nebenwirkungsprofil aufweisen.

Indem das körpereigene Immunsystem gestärkt und so für eine ausreichende Tumorabwehr gesorgt wird, könnte eine Tumorprogression aufgehalten und gleichzeitig von den anderen positiven Effekten einer starken Immunreaktion profitiert werden. Mit Hilfe von Vitamin-D, dessen immunmodulatorische Fähigkeiten in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnte (Adams & Hewison, 2010; Baeke et al., 2010; Hewison et al., 2001; Lemire et al., 1984; Manson et al., 2019), wäre ein kostengünstiger therapeutischer Ansatz gegeben, der zudem sehr gut verträglich ist. Da HNSCC Patienten allgemein eine deutliche Dysfunktion des Immunsystems zeigen, die auch für ein reduziertes Gesamtüberleben und die schlechten Prognoseaussichten mitverantwortlich ist (Bergmann et al., 2008; Russell et al., 2011; Wild et al., 2010), könnte Vitamin-D im Kontext eines immunonkologischen Therapiekonzepts einen wichtigen Beitrag leisten. Die Tatsache, dass sich unter den Kopf-Hals-Tumorpatienten häufig ein Vitamin-D-Mangel zeigt, der nachgewiesenermaßen ein Prädiktor für eine schlechtere Prognose ist, unterstreicht dieses therapeutische Potential von Vitamin-D in der Kopf-Hals-Onkologie.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Vitamin-D auf die Zusammensetzung von regulatorischen Immunzellpopulationen und deren Effektormoleküle im immunologischen Tumormikromilieu von Patientin mit einem Plattenepithelkarzinom des

2. Einleitung

Kopf-Hals-Bereichs. Hierfür wurde ein Kollektiv von 116 HNSCC-Patienten herangezogen, von denen 53 Patienten einen ausreichenden Vitamin-D-Status mit einem 20-OH-Vitamin-D Serumspiegel von über 15 ng/ml aufwiesen und 63 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel bei einem Spiegel unter 10 ng/ml gekennzeichnet waren. Anschließend wurden die 116 Tumorgewebebeurteilungen des Kollektivs anhand eines bereits etablierten Protokolls mithilfe von monoklonalen Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Untersucht wurde die Expression der fünf Moleküle CD20, CTLA4, FasL, FoxP3 und IL10 auf B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen im intra- und peritumoralen Stroma von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status. So sollte das Ausmaß der Expression der einzelnen Moleküle mit dem Vitamin-D-Status korreliert und wiederum von diesem abhängig, der Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Herstellernachweis

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle 1 sind die in den Versuchen verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellernachweis

| Hersteller | Beschreibung |
|--|--|
| Abimed, Düsseldorf | Gilson-Pipetten |
| B. Braun, Melsungen | Aqua dest. |
| Carl Zeiss AG, Oberkochen | Durchlichtmikroskop, 4316184 |
| Dako GmbH, Glostrup, Dänemark | REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED |
| Exquisit, Kaarst | Mikrowelle, MW 802 Si |
| Heraeus Instruments, Osterode | Tischzentrifuge (Biofuge pico) |
| IKA, Staufen i. Breisgau | Magnetrührer C-MAG HS 7 |
| | Vortex-Mixer (IKA-VIBRO-FIX) |
| Integra Biosciences, Biebertal | Pipetboy acu |
| Leica Microsystems, Wetzlar | Rotationsmikrotom SM2400; |
| | Rotationsmikrotom RM2125RT |
| MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg | Wärmeschrank, Incucell |
| Medax Nagel GmbH, Kiel | Wasserbad, Medax Typ WB24 |
| R. Langenbrick, Emmendingen | SuperFrost Plus Objektträger |
| | Deckgläser |
| Sakura Finetek Germany Gmb, Staufen | Reagens-Transfer-Prozessor, Tissue-Tek®VIP™5 |
| Sarstedt, Nümbrecht | Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße |
| Sartorius, Göttingen | Feinwaagen BP 61, BP4100 |
| Schleicher und Schüll, Dassel | Filterpapier, DE81 |
| Tefal S.A.S, Rumilly, Frankreich | Classic 2 Reiskocher |
| Thermo Shadon GmbH, Frankfurt am Main | Einbettungsgerät, Histocentre 2 |
| WTW, Weilheim | pH-Meter, pH 197 |

3. Material und Methoden

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2 zeigt die angewandten Chemikalien und den Herstellernachweis.

Tabelle 2: Chemikalien und Herstellernachweis

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

3.1.3 Lösungen und Puffer

In Tabelle 3 sind die verwendeten Lösungen und Puffer aufgelistet.

Tabelle 3: Lösungen und Puffer mit ihrer Zusammensetzung

| Lösung und Puffer | Zusammensetzung |
|--|---|
| 1 M Tris-Lösung | 12,11 g Tris-Base <i>ad</i> 100 ml Aqua dest. |
| 0,5 M EDTA-Lösung; PH 8,0 | 93,06 g EDTA <i>ad</i> 300 ml Aqua dest. |
| Tris-EDTA Retrievalpuffer; pH 9,0 / pH 6,0 | 296,4 ml Aqua dest. 3,0 ml 1 M Tris-Lösung 600 µl 0,5 M EDTA-Lösung |
| 5 % (w/v) BSA in PBS (pH 7,2) | 5 g BSA <i>ad</i> 100 ml PBS |
| 3 % (w/v) BSA in PBS (pH 7,2) | 3 g BSA <i>ad</i> 100 ml PBS |
| 1 % (w/v) BSA in PBS (pH 7,2) | 1 g BSA <i>ad</i> 100 ml PBS |

3.1.4 Primärantikörper

Tabelle 4: Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben

| Antikörper | Herkunft | Beschreibung | Verdünnung (IHC) |
|------------|----------------------------------|---|------------------|
| Anti-CD20 | Abcam, England; Art. ab9475; | Monoklonaler Peptidantikörper Maus; Clone L26 | 1:150 |
| Anti-CTLA4 | Abcam, England; Art. ab237712 | Monoklonaler Peptidantikörper Kaninchen; Clone CAL49 | 1:500 |
| Anti-FasL | Abcam, England; Art. ab15285 | Polyklonaler Peptidantikörper Kaninchen; | 1:900 |
| Anti-FoxP3 | Abcam, England; Art. ab22510 | Monoklonaler Peptidantikörper Maus; Clone mAbcam 22510 | 1:125 |
| Anti-IL10 | Abcam, England; Art. ab134742 | Monoklonaler Peptidantikörper Maus; Clone 4A7-25-17 | 1:500 |

3.2 Immunhistochemische Analysen

3.2.1 Funktionsprinzip der Immunhistochemie (IHC)

Ziel der Immunhistochemie ist es, mit Hilfe von Antikörpern Proteine in histologischen Gewebeschnitten qualitativ und quantitativ darzustellen. Dabei macht man sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze. Antikörper haben eine hohe Affinität zu einem spezifischen Abschnitt des zugehörigen Antigens, dem sogenannte Epitop. Indem sie hieran binden, machen sie weitere Schritte zur Detektion der Zielproteine möglich. Diese Schritte umfassen zum einen das Binden eines Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, das Binden eines Enzymkonjugats an den Sekundärantikörper und zum Schluss eines Substrates bzw. Chromogens an das Enzymkonjugat. Insgesamt wird dies als indirekte Immunhistochemie mithilfe eines Detektionssystems für den enzymatischen Nachweis bezeichnet. Diese Form der Immunhistochemie bietet zwei Vorteile: Einerseits dient sie der Visualisierung, andererseits der Verstärkung des Signals, um auf diese Weise genauer zwischen

3. Material und Methoden

unspezifischem und dem erwünschten Signal differenzieren zu können. Die im nächsten Abschnitt beschriebene Fixierung des Gewebes mit all ihren Schritten kann die Antigene strukturell modifizieren, indem es unter anderem zu Proteinquervernetzungen kommen kann. Die dadurch ausgelöste Reduktion der Immunreaktivität kann durch eine Demaskierung im Retrievalpuffer teilweise rückgängig gemacht werden. Die genauen Schritte der immunhistochemischen Färbung werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

3.2.2 Fixierung des Gewebes

Alle in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen aus den Primärtumoren der Patienten, die entweder im Rahmen der diagnostischen Panendoskopie oder im Rahmen einer kurativ intendierten Tumorresektion entnommen wurden. Diese Gewebeproben wurden nach der Entnahme in einem PBS-gepufferten, 4%igen-Formalin je nach Größe für mindestens 12 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

So erhielt man FFPE (Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete) -Gewebeproben. Die weiteren Schritte des Reagenz-Transferprozesses fanden automatisiert, entsprechend der Schilderung in Tabelle 5 mithilfe des Tissue-Tek®VIPTM5 JR statt. Die Fixierung und Einbettung der Gewebeproben erfolgten im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes.

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

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

Anschließend wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben mithilfe des Rotationsmikrotoms Leica RM 2235 geschnitten. Die ersten drei Schnitte von je 10 µm Dicke wurden verworfen, um dann 4 µm-Schnitte herzustellen. Diese konnten nach gleichmäßigem Strecken im 37°C warmen Wasserbad auf SuperFrost Plus Objektträger übertragen werden. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte über Nacht getrocknet, um anschließend für 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank aufbewahrt zu werden. So wurde eine optimale Verbindung der Schnitte mit den Objektträgern erreicht und es konnte ein vorzeitiges Ablösen der Präparate vermieden werden.

3.2.3 Etablierungen der immunhistochemischen Färbeprotokolle

Jeder FFPE-Schnitt der insgesamt 116 eingeschlossenen Patienten wurde spezifisch anhand eines angepassten Färbeprotokolls immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurde ein Grundlagenprotokoll von Dr. rer. nat. Florian Bochen (ehemaliger naturwissenschaftlicher Doktorand der Arbeitsgruppe „Kopf-Hals-Onkologie“ der HNO-Klinik des UKS in Homburg, derzeit Postdoc am Institute of Biochemistry and Molecular Medicine der Universität Bern) verwendet. Dieses Protokoll musste vor jeder Färbung an den jeweiligen Antikörper adaptiert werden. Zusätzlich wurde bei jedem Färbvorgang eine Positiv- und Negativkontrolle eines bereits bekannten Tonsillen-Präparats zur besseren Überprüfung der Färbequalität mitgeführt.

Bevor die Antikörper an den FFPE-Schnitten der Tumorpatienten angewandt wurden, dienten Tonsillen, welche im Rahmen einer elektiven Tonsillektomie von Patienten entnommen wurden und als Gewebespender zur Verfügung standen, als Präparate für die Etablierung. Im nächsten Schritt wurden HNSCC-Patientenpräparate anhand des nun schon spezifischeren Protokolls gefärbt, die nicht Teil des eigentlichen Kollektivs, sondern Bestand des Forschungslabors der HNO-Klinik waren. So wurde sich immer weiter an das Zielmaterial angenähert und Übertragungsfehler durch den Umstieg von gesundem Gewebe im Rahmen der Etablierung auf Tumorgewebe konnten minimiert werden, ohne dass dabei auf Gewebe aus dem Tumorpatientenkollektiv der durchgeführten Studie zurückgegriffen werden musste.

Im Rahmen der einzelnen Etablierungen ergaben sich unterschiedliche Färbequalitäten der Präparate, die je nach aufgetretenem Problem eine Optimierung im Färbeprotokoll nach sich zogen. Eine erste Variable war bei diesen Etablierungsschritten der pH-Wert des Retrieval-Puffers. Es zeigte sich bei allen fünf Antikörpern, dass sich bei Demaskierungsvorgängen mit einem pH-Wert von 9 das Färbeergebnis besser als bei einem pH von 6 (Citrat-Retrievalpuffer) darstellte. So wurde in den weiteren Versuchen der pH 9,0-Tris-EDTA-Retrievalpuffer verwendet. Im nächsten Schritt wurde die Demaskierungszeit im Retrieval-Puffer angepasst. Dabei wurde ein Ausgangswert von 20 Minuten schrittweise reduziert. Es

3. Material und Methoden

ergaben sich hierbei für CD20 optimale Bedingungen bei 18 Minuten, für CTLA4 bei 15 Minuten, für FasL bei 11 Minuten, für FoxP3 bei 13,5 Minuten und für IL10 bei 13 Minuten.

Zur weiteren Optimierung konnte die Antikörper-Konzentration bzw. Verdünnung des Antikörpers angepasst werden. Im ersten Färbeversuch wurde die Verdünnungsempfehlung des Herstellers abcam verwendet, um diese dann je nach Färbeergebnis anzupassen. Abcam empfahl für CD20 eine Verdünnung von 1:20 bis 1:50, für CTLA4 von 1:500, für FasL von 1:100, für FoxP3 von 1:1000, und für IL10 von 1:200. Letztendlich ergab sich nach mehreren Etablierungsversuchen als geeignetste Verdünnung mit der besten Färbeintensität für CD20 eine Verdünnung von 1:150, für CTLA4 von 1:500, für FasL von 1:900, für FoxP3 von 1:125 und für IL10 von 1:500. Als letzter Optimierungsschritt des Färbeprotokolls wurde eine Verwendung von Tween 20 (Polysorbat 20) getestet. Hierbei handelt es sich um ein Tensid, das als Detergens die Permeabilität der Zellmembran für die verwendeten Antikörper erhöht. Von Vorteil ist Tween 20 deswegen vor allem bei Zielproteinen, die im Zytoplasma oder intranukleär lokalisiert sind. Bei CD20, das in der Membran lokalisiert ist, war das Färbeergebnis auch ohne Tween 20 optimal. Bei FoxP3, das sich im Zellkern befindet, bei CTLA4 das in der Zellmembran lokalisiert ist, beim zytoplasmatischen IL10 und auch bei FasL, das in der Zellmembran sowie durch Proteolyse auch im Plasma löslich auffindbar ist, ergaben sich durch Tween 20 deutlich bessere Färbeergebnisse. Tween 20 wurde folglich für die letztgenannten vier Antikörper in den Waschpuffer, sowie in die Blockierungs- und Antikörper-Inkubationslösung hinzugegeben, sodass es dort in 0,1%iger Konzentration vorlag.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch den Etablierungsprozess der immunhistochemischen Färbung am Beispiel des Antikörpers gegen CD20. Während im Bild A unter 16 min Demaskierungszeit und einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 noch ein deutliches, unspezifisches Hintergrundsignal zu sehen ist, erkennt man in Bild B und C, dass eine Verdünnung von 1:275 bei einer Demaskierungszeit von 15 min ein zu schwaches spezifisches Signal erzeugt. Die finalen, optimalen Bedingungen für den Antikörper gegen CD20 sind in Bild C dargestellt. Bei 18 min Demaskierungszeit, einer Verdünnung von 1:150 und einem Puffer von pH 9 ist das Signal spezifisch, distinkt und stark, ohne zu viel begleitendes, unspezifisches Hintergrundsignal zu erzeugen.

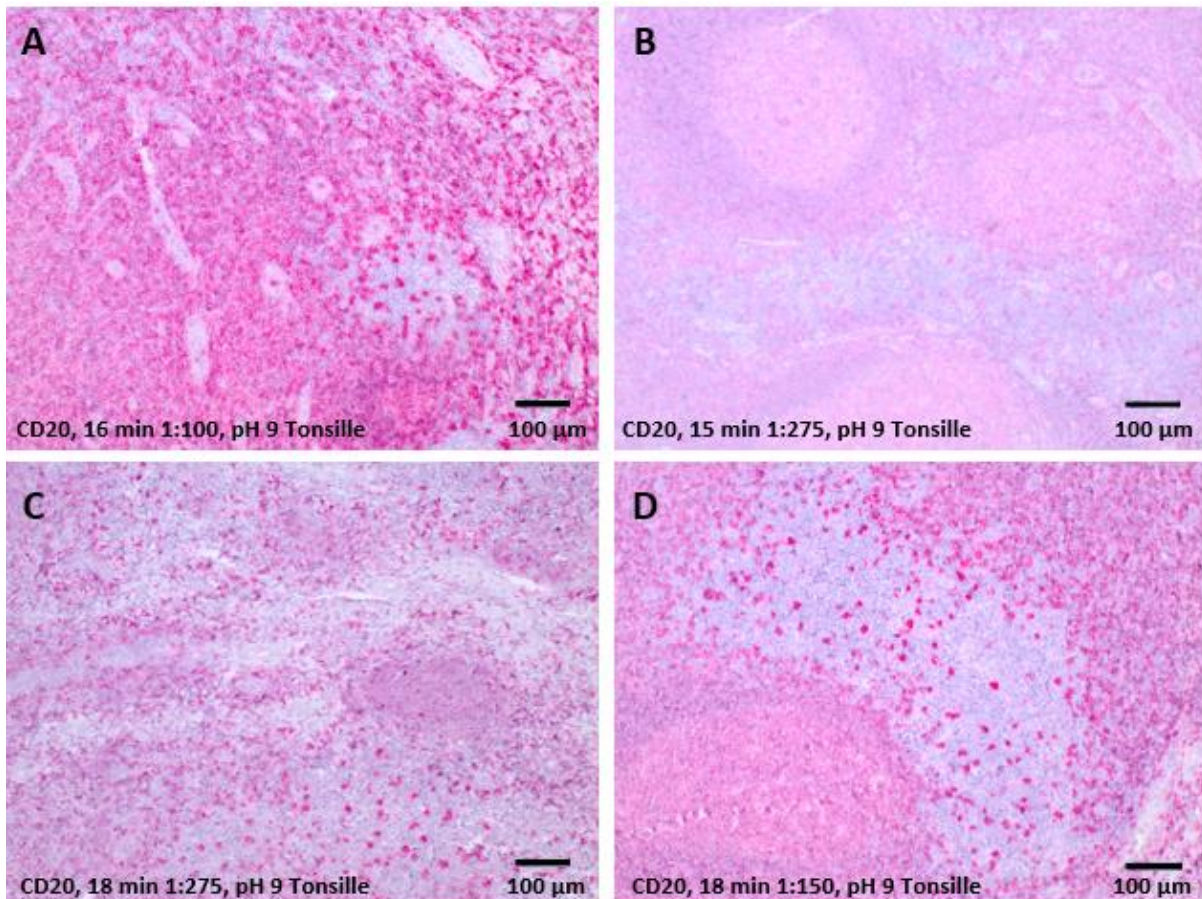


Abbildung 4: Darstellung der Etablierungsreihe des Antikörpers CD20: In Bild **A** ist der erste Etablierungsversuch mit einer 16-minütigen Demaskierungszeit, einem Puffer von pH 9 und einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 dargestellt. Die weiteren Bilder **B**, **C** und **D** zeigen weitere Anpassungen an dem Tonsillenpräparat unter den in den jeweiligen Bildern angegebenen Färbebedingungen.

3.2.4 Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen

Nachdem die FFPE-Schnitte wie bereits beschrieben für 24 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert wurden, erfolgte die Entparaffinierung der FFPE-Gewebeschnitte für 10 min in einer unabhängigen Xylol-Küvette. Danach wurden sie jeweils 10-mal für 30 sec in drei neuen Xylol-Küvetten geschwenkt. Da Xylol und Wasser eine Emulsion bilden, folgte als vorbereitender Zwischenschritt dasselbe Schwenken in erst drei 100%igen und folgend in drei 70%igen Ethanolküvetten. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit Aqua dest. geschwenkt. Nun folgte der Kochvorgang bei 95°C im Tris-EDTA-Retrievalpuffer bei pH 9,0. Dafür wurde der in einer Plastikküvette angesetzte Puffer ohne Präparate 3 min in der Mikrowelle auf über 95 °C erhitzt, sodass er kochte. Anschließend wurden die Präparate zügig in diese Küvette überführt, um sie dann in einen Reiskocher zu stellen, der die Temperatur des Puffers konstant bei 95°C aufrecht erhielt. Die Dauer des Kochens hing dabei von der spezifischen Demaskierungszeit der Antikörper ab (siehe oben).

3. Material und Methoden

Im nächsten Schritt mussten die Präparate in der Küvette für ca. 30 min abkühlen, bis sie eine Temperatur von $< 50^{\circ}\text{C}$ erreichten. Anschließend wurden sie für 4-mal 2 min in einer mit PBS-Puffer (pH 7,2) gefüllten Küvette gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in einer 3% beziehungsweise 5% BSA-PBS-Lösung (pH 7,2). Das BSA diente dabei zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, damit die stattdessen sonst bindenden Antikörper nicht zu unspezifischen Signalen führen. Als nächstes folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (CD20, CTLA4, FasL, FoxP3, IL10), die in der jeweiligen Verdünnung mit einer 1% BSA-PBS-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer stattfand. Auf die Negativkontrollen wurde statt des Antikörpers lediglich eine 1% BSA-PBS-Lösung gegeben. Danach wurden die Schnitte erneut wie oben beschrieben mit PBS gewaschen, um anschließend wiederum für 30 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper aus dem Dako REAL Detection System inkubiert zu werden. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, dem sich das 30-minütige Einwirken der Streptavidin-Alkalischen-Phosphatase aus demselben Kit anschloss. Danach wurde erneut mit einer PBS-Lösung gewaschen und es folgte die Färbung der Präparate für 15 min mit einer Substrat-Chromogen-Lösung.

Als nächstes wurden die Schnitte für 5 min in Aqua dest. gespült, um danach für 7 min gegengefärbt zu werden. Hierfür wurde Sigma Aldrich Hämatoxylin eingesetzt. Das anschließende, 10-minütige Wässern unter fließendem Wasser, sollte zu einem Farbumschlag des Hämatoxylins führen. Bevor die Schnitte mit Entellan eingedeckt werden konnten, mussten sie eine aufsteigende Alkohol-, gefolgt von einer Xylolreihe durchlaufen.

Für einen besseren Überblick über den Ablauf des Protokolls sind in Tabelle 6 noch einmal alle Schritte mit den entsprechenden Inkubationszeiten zusammengefasst.

Tabelle 6: Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbung

| Zeitangabe | Durchgeführte Maßnahme |
|-------------------|--|
| 24 h | Fixierung im Wärmeschrank bei 37°C |
| 10 min | Entparaffinieren in unabhängigem Xylol |
| 3 x 30 sec | Schwenken im Xylol |
| 3 x 30 sec | Schwenken im 100%igen Alkohol |
| 3 x 30 sec | Schwenken im 70%igen Alkohol |
| 2 x 30 sec | Schwenken im Aqua dest. |
| 11 – 18 min | Demaskierung durch Kochen im Retrievalpuffer |
| 30 min | Abkühlen unter 50°C |
| 4 x 2 min | Waschen im PBS-Puffer |
| 30 min | Inkubation mit 3% / 5% BSA-PBS-Lösung |

| Zeitangabe | Durchgeführte Maßnahme |
|-------------------|--|
| 1 h | Inkubation des Primärantikörpers bei 20 °C |
| 4 x 2 min | Waschen im PBS-Puffer |
| 30 min | Inkubation des Sekundärantikörpers |
| 4 x 2 min | Waschen im PBS-Puffer |
| 30 min | Inkubation der alkalischen Phosphatase |
| 4 x 2 min | Waschen im PBS-Puffer |
| 15 min | Inkubation der Substrat-Chromogen-Lösung |
| 5 min | Spülen mit Aqua dest. |
| 7 min | Färben mit Hämatoxylin |
| 10 min | Fließend wässern |
| 3 x 30 sec | Schwenken im 70%igen Alkohol |
| 3 x 30 sec | Schwenken im 100%igen Alkohol |
| 3 x 30 sec | Schwenken im Xylol |
| | Eindecken mit Entellan |

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Hilfe eines immunreaktiven Scores (IRS) ausgewertet. Der erstmals von Remmele und Stegner (Remmele Stegner 1987) beschriebene IRS wurde ursprünglich zum Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf den Oberflächen von Mamma-Karzinom-Zellen entwickelt. Dieser wurde in unserem Versuchsablauf für die Antikörper CD20 und FoxP3 leicht abgewandelt, um individuellere Aussagen zu ermöglichen. Er umfasst in der ursprünglichen Form die beiden Kategorien der Färbeintensität sowie der Anzahl positiver Zellen in einer Skala ganzer Zahlen von 0 bis 3 beziehungsweise 0 bis 4. Die 0 entspricht dabei dem Befund „keine Färbereaktion“ bzw. in der zweiten Kategorie dem Befund „keine positiven Zellen“. Die 1 steht für „schwache Reaktion“ bzw. „weniger als 10% positive Zellen“, die 2 veranschaulicht eine „mäßige Reaktion“ bzw. „zwischen 10% und 50% positive Zellen“, die 3 „starke Reaktion“ bzw. zwischen „51% und 80%“ positive Zellen und die 4 bedeutete „mehr als 80%“ positiver Zellen. Diese zwei Zahlen werden nach entsprechender Klassifikation der Färbeintensität und der prozentualen Zahl positiver Zellen miteinander multipliziert und ergaben dann den Immunreaktiven Score des Präparates mit Werten zwischen 0 und 12. Dieser Score wurde zum einen auf den intratumoralen als auch auf den direkt an den Tumor angrenzenden peritumoralen Bereich der Präparate angewandt, wobei für alle verwendeten Antikörper die spezifische Reaktivität der Immunzellen ausgewertet wurde. Im für zwei Antikörper verwendeten modifizierten IRS (mIRS) wurde stattdessen die absolute Anzahl der

3. Material und Methoden

im gesamten Präparat vorhandenen Leukozyten und die relative Anzahl der davon gefärbten Immunzellen erfasst. Dies ergab sich durch die kontinuierlich hohe Intensität der Färbung bzgl. CD20 und FoxP3, sodass der abgewandelte Score sinnvoller erschien. Dieser mIRS wurde in seiner Skala und Rechenweise genau wie der ursprüngliche IRS kalkuliert, sodass die beiden Kategorien Werte zwischen 0-3 bzw. 0-4 und der Gesamtscore Werte zwischen 0 und 12 erreichen konnte. Für die Antikörper gegen FasL sowie IL10 wurde der Score lediglich erweitert, bei CTLA4 konnte er in seiner ursprünglichen Form wie zuvor dargestellt angewandt werden. Die Erweiterung bei FasL und IL10 ergab sich durch ein zweiteiliges Färbeverhalten der beiden Antikörper, die sich zum einen als lösliches, flächiges Signal und zum anderen sehr lokalisiert und distinkt präsentierten. So wurden die beiden Signalformen separat und auch intra- und peritumoral gemäß des Originalscores bewertet. Übereinstimmend bei allen fünf Antikörpern lag der maximal zu erreichende Wert bei 12 Punkten, der allerdings bei CD20 und FoxP3 bedeutet, dass >80% der stark vorhandenen Immunzellen innerhalb des Tumors oder im Stroma vom Antikörper gefärbt sind, bei den restlichen drei, dass mit sehr starker Färbeintensität >80% der Immunzellen gefärbt sind.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte manuell mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops von zwei unabhängigen Auswertern, die hinsichtlich der histologischen Diagnose, der klinischen Daten und der Bewertung des jeweils anderen Untersuchers verblindet waren.

3.3.2 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Im ersten Schritt wurden die ermittelten IRS-Werte mittels des D'Agostino-&Pearson-Normality-Tests auf ihre Normalverteilung geprüft, dem ein zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben und ein t-Test für normalverteilte, unverbundene Stichproben folgte. Die Überlebensdaten der Patienten wurden anhand eines log-rank-Tests nach Mantel und Cox analysiert. Als statistisch signifikant galten dabei p-Werte $< 0,05$ ($\alpha=0,05$).

3.3.3 TNM-Klassifikation und Tumordifferenzierung

Das weltweit anerkannte System zur Einschätzung der Tumorausbreitung ist die international standardisierte TNM-Klassifikation. Diese wurde erstmals 1950 von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) erstellt und wird seither kontinuierlich aktualisiert und erweitert (Brierly et al., 2017; Wittekind & Oberschmid, 2010). TNM ist dabei ein Akronym bestehend aus „Tumor“, „Nodus“ und „Metastasen“. „T“ beschreibt die Ausdehnung und Größe des Primärtumors, „N“ den Status befallener, regionärer Lymphknoten und „M“ das Vorhandensein von Fernmetastasen. Anhand von Präfixen und nachgestellten Zahlen

werden die Buchstaben weiter spezifiziert. Vor die TNM-Buchstaben kann ein „c“ angegeben werden, was für ein Staging anhand klinischer Kriterien spricht, oder aber ein „p“ für ein histopathologisches Staging (Brierly et al., 2017; Wittekind & Oberschmid, 2010). Letztendlich können mit Hilfe des TNM-Systems auf diese Weise klinische Fälle und deren Verläufe verglichen werden und einheitliche Therapieempfehlungen abhängig vom TNM-Stadium erarbeitet werden.

In dieser Arbeit wurde die siebte TNM-Klassifikation für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs von 2009 verwendet (Paleri et al., 2010). Seit 2016 existiert zwar eine achte Auflage der Klassifikation, diese wurde allerdings auf Grund der Rekrutierung des Fallkollektivs im Zeitraum von 2013 bis 2016 nicht angewendet. Neben der TNM-Klassifikation existiert eine weitere Klassifikation der UICC, die eine klinische Einteilung in Stadien von 0 bis IVc vornimmt, ebenfalls abhängig vom jeweiligen TNM-Stadium (Reiß, 2021). Zudem kann eine Einteilung der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs nach histologischen Differenzierungsgraden erfolgen. Beim Grad 1 (G1) liegen dabei gut differenzierte Karzinome mit wenig Mitosen vor, Grad 2 (G2) entspricht einer mäßigen Differenzierung und beim Grad 3 (G3) implizieren u.a. viele Mitosen eine schlechte Differenzierung. Anhand dieser Einteilung lassen sich Rückschlüsse auf die Malignität sowie Prognose des Tumors ziehen (Reiß, 2021).

3.3.4 Anonymisiertes Patientenkollektiv

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst 116 HNSCC-Patienten, die sich unter anderem in ihren Vitamin-D-Serumspiegeln unterscheiden. Bei 53 Patienten wurde ein 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von über 15 ng/ml, bei weiteren 63 hingegen einen Spiegel von unter 10 ng/ml nachgewiesen. Dabei wurden alle Patientenproben vom Pathologischen Institut der Universität des Saarlandes als Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich anhand histo- und zytomorphologischer Merkmale fakultativ mit ergänzender immunhistochemischer Testung klassifiziert.

Für die wissenschaftliche Nutzung der Patientendaten und des Gewebematerials sowie die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten Versuche lag vor Beginn der Untersuchungen ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vor (280/10). Das komplette HNSCC-Patientenkollektiv ist nachfolgend in anonymisierter Darstellung aufgeführt.

3.3.4.1 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (n=63)

Tabelle 7: Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (n=63)

| Geschlecht | Alter bei Diagnose | Diagnose | TNM-Stadium | UICC-Stadium | 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel [ng/ml] |
|------------|--------------------|--------------------------------|------------------|--------------|--------------------------------------|
| m | 79 | Tonsillen-CA | pT1 pN1 cM0 G3 | 3 | 4 |
| m | 70 | Zungengrund-CA | cT3 cN2c cM0 G2 | 4a | 4 |
| m | 60 | Hypopharynx-CA | cT2 cN0 cM0 G2 | 2 | 4 |
| m | 51 | Tonsillen-CA | cT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 8,1 |
| m | 49 | Zungengrund-CA | cT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 8,9 |
| m | 69 | Tonsillen-CA | pT2 pN2c cM0 G2 | 4a | 7,5 |
| w | 53 | Tonsillen-CA | pT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 8,3 |
| m | 74 | Larynx-CA | cT2 cN0 cM0 G2 | 2 | 7,6 |
| m | 61 | Larynx-CA | cT3 cN3 cM0 G2 | 4b | 4,2 |
| m | 60 | Larynx-CA | cT2 cN2b cM0 G1 | 2 | 9,3 |
| m | 57 | Oropharynx-, Zungengrund-CA | rcT2 pN1 cM0 G2 | 2 | 8,4 |
| m | 68 | Hyopharynx-, Larynx- CA | pT4a pN1 cM0 G2 | 4a | 5,6 |
| m | 53 | Hypopharynx-CA | pT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 9,9 |
| w | 67 | Larynx-CA | pT1a cN0 cM0 G3 | 4a | 4,8 |
| m | 74 | Larynx-CA | pT4a pN2c cM0 G3 | 1 | 6,5 |
| m | 78 | Larynx-CA | cT3 cN2b cM0 G2 | 4a | 4 |
| m | 73 | Hypopharynx-CA | cT2 cN3 cM0 G2 | 4a | 7,8 |
| m | 55 | Zungengrund-CA | cT4 cN2c cM0 G2 | 4b | 5,3 |
| m | 59 | Hypopharynx-, Larynx- CA | cT4 cN2b cM0 G2 | 4a | 7,8 |
| m | 69 | Larynx-CA | cT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 6,7 |
| m | 71 | Larynx-CA | pT2 pN2b cM0 G2 | 4a | 9 |
| m | 64 | Zungen-CA | cT2 cN0 cM0 G1 | 4a | 8,8 |
| m | 67 | Mundboden-CA | pT1 pN0 cM0 G2 | 2 | 5,8 |
| m | 42 | Zungen-CA | cT3 cN0 cM0 G3 | 1 | 6 |
| m | 66 | Zungen-CA | cT4b cN3 cM0 G2 | 4b | 6,4 |
| m | 65 | Zungengrund-CA | cT4 cN2c cM0 G2 | 4a | 4 |
| w | 78 | Tonsillen-CA | cT2 cN2b cM0 G3 | 4a | 8,1 |
| m | 64 | Larynx-CA | cT4 pN0 cM0 G2 | 4a | 7 |
| m | 56 | Zungengrund-CA | pT2 pN1 cM0 G2 | 3 | 6,2 |
| m | 63 | Zungengrund-CA | pT1 pN2b pM1G3 | 4c | 8 |

| Geschlecht | Alter bei Diagnose | Diagnose | TNM-Stadium | UICC-Stadium | 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel [ng/ml] |
|------------|--------------------|---------------------------------------|------------------|--------------|--------------------------------------|
| m | 53 | Hypopharynx-CA | cT4 cN2b cM0 G3 | 4a | 4 |
| m | 58 | Zungengrund-CA | cT3 pN2b cM0 G3 | 4a | 8 |
| m | 47 | Tonsillen-CA | pT1 pN1 pM1 G2 | 3 | 8 |
| m | 64 | Oropharynx-CA | cT4a cN2c cM0 G3 | 4a | 4,9 |
| m | 74 | Oro-, Hypopharynx-, Larynx-CA | cT4a pN0 cM0 G3 | 4a | 5,5 |
| m | 65 | Zungengrund-CA | cT4b cN3 cM1 G3 | 4c | 8,5 |
| m | 56 | Larynx-CA | cT2 cN0 cM0 G3 | 2 | 4,5 |
| w | 56 | Tonsillen-CA | cT3 cN2b cMx G3 | 4c | 5,6 |
| m | 50 | Larynx-CA | cT2 pN1 cM0 G2 | 3 | 5,9 |
| m | 59 | Zungen-CA | cT3 cN1 cM1 G2 | 4c | 5,3 |
| m | 87 | Rachenhinterwand-CA | cT3 cN1 cM0 G3 | 3 | < 4 |
| w | 66 | Hypopharynx-CA | cT2 cN3 cM0 G2 | 4b | 5,8 |
| w | 58 | Tonsillen-CA | cT4 pN2b cM0 G3 | 4a | 5,4 |
| m | 59 | Mundboden-CA | pT2 pN3 cM0 G2 | 4b | 5,4 |
| m | 80 | Larynx-CA | cT4 cN0 cM0 G2 | 4a | 6,6 |
| m | 71 | Oro-/Hypopharynx-CA | cT3 cN2c cM0 G3 | 4c | 5,8 |
| m | 65 | Larynx-CA | cT1a cN0 cM0 G1 | 1 | 9,2 |
| m | 73 | Oropharynx, Hypopharynx und Larynx-CA | cT4c N2b cM0 G3 | 4a | 8,7 |
| m | 57 | Larynx-CA | cT1a cN0 cM0 G2 | 1 | 5,8 |
| m | 57 | Larynx-CA | cT2 pN0 cM0 G2 | 2 | 5,3 |
| m | 64 | Larynx-CA | cT3 pN0 cM0 G2 | 3 | 7,8 |
| m | 60 | Larynx-CA | cT3 cN0 cM0 G2 | 3 | 8,2 |
| m | 57 | Uvula-CA | pT2 pN2c cM0 G2 | 4a | 9,1 |
| m | 71 | Larynx-CA | pT2 cN2b cM0 G2 | 4a | 5,5 |
| m | 55 | Zungengrund-CA | pT1 pN2a cM0 G2 | 4a | 5,4 |
| m | 48 | Zungengrund-CA | pT3 pN0 cM0 G2 | 3 | 6,1 |
| m | 75 | Hypopharynx-CA | cT2 pN0 cM0 G3 | 2 | 8,6 |
| w | 68 | Hypopharynx-CA | cT3 cN0 cM0 G2 | 3 | 4,2 |
| m | 58 | Hypopharynx-CA | pT4a pN2c cM0 G3 | 4a | 4,8 |
| m | 68 | Larynx-CA | cT2 pN2b cM0 G2 | 4a | 4,8 |
| m | 76 | Hypopharynx-CA | cT3 pN2 cM0 G3 | 4a | 6,8 |
| m | 58 | Mundboden-CA | cT2 pN0 cM0 G3 | 2 | 5,9 |
| w | 64 | Oro-, Hypopharynx-, | pT4a pN2c cM0 G3 | 4a | 4 |

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

Tabelle 8: Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (n=53)

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

| Geschlecht | Alter bei Diagnose | Diagnose | TNM-Stadium | UICC-Stadium | 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel [ng/ml] |
|-------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|---|
| m | 56 | Mundboden-CA | cT1 cN0 cM0 G2 | 1 | 25,2 |
| m | 52 | Larynx-CA | pT2 pN0 cM0 G2 | 2 | 11,9 |
| m | 52 | Mundboden-CA | cT2 pN2c cM0 G2 | 4a | 64,1 |
| m | 78 | Larynx-CA | pT1b cN0 cM0 G2 | 1 | 22,1 |
| m | 80 | Tonsillen-CA | pT2 (cT1) pN1 cM0 G3 | 3 | 21,5 |
| w | 65 | Tonsillen-CA | cT1 pN0 cM0 G3 | 1 | 21,6 |
| m | 82 | Larynx-CA | cT3 pN1 cM0 G3 | 3 | 16,1 |
| m | 75 | Tonsillen-, Zungengrund-CA | pT3 pN2c cM0 G3 | 4a | 23,4 |
| m | 71 | Zungenrand-CA | cT2 pN1 cM0 G3 | 3 | 15,7 |
| m | 80 | Tonsillen-CA | cT3 cN2b cM0 G3 | 4a | 21,1 |
| w | 54 | Zungen-CA | pT2 pN0 cM0 G2 | 2 | 15,8 |
| m | 79 | Tonsillen-CA | cT3 cN2b cM0 G3 | 4a | 17,5 |
| m | 63 | Tonsillen-CA | cT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 11,2 |
| m | 80 | Zungengrund-CA | pT2 pN2b cM0 G3 | 4a | 25,1 |
| m | 82 | Mehretagen von Tonsillen-CA | cT4b cN2c cM0 G2 | 4a | 16,7 |
| w | 47 | Zungen-CA | pT1 pN0 cM0 G2 | 1 | 22,8 |
| w | 63 | Naso-, Oro-, Hypopharynx-CA | cT4 pN2c cM0 G2 | 4a | 22,1 |
| w | 87 | Tonsillen-CA | cT2 cN0 cM0 G2 | 2 | 29,9 |
| m | 60 | Tonsillen-CA | pT1 pN0 cM0 G2 | 1 | 16,4 |
| m | 73 | Oro-, Hypopharynx, Larynx-CA | cT4 cN2b cM0 G2 | 4a | 16,6 |
| w | 58 | Tonsillen-CA | cT4 pN2c cM0 G3 | 4a | 16,5 |
| m | 66 | Tonsillen-CA | cT2 pN1 cM0 G3 | 3 | 19,4 |

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Das aus 116 HNSCC-Patienten/innen bestehende Kollektiv gliedert sich in 95 Patienten männlichen und 21 Patientinnen weiblichen Geschlechts (Abb. 5). Das durchschnittliche Alter der Frauen betrug 62,8 Jahre, das der Männer 64,4 Jahre. Bei allen im HNSCC-Kollektiv eingeschlossenen Patienten wurde ein Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes diagnostiziert. Es traten Stadien von cT1a cN0 cM0 bis hin zu cT4b cN3 cM1 auf. Bzgl. der HPV-Assoziation von Kopf-Hals-Tumoren, insbesondere der Oropharynxkarzinome, existiert bisher keine einheitliche diagnostische Methode, möglich ist der direkte Nachweis der HPV-DNA durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) oder durch eine DNA-in-situ-Hybridisierung. Hinzu kommt der häufig als Surrogatparameter verwendete, immunhistochemische Nachweis von Proteinbiomarkern wie beispielsweise p16INK4a, pRb, p53 und Cyclin D1. Aus diesem Grund wurde im vorliegenden HNSCC-Kollektiv einerseits die HPV-DNA mit einer spezifischen PCR bestimmt, andererseits immunhistochemisch mit Hilfe eines CINtec PLUS-Kits das eine potenzielle duale Expression von p16 und Ki67 analysiert (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Bei diesem wurde Ki67 als Marker für eine hohe Zellproliferationsrate und p16INK4a als Biomarker für die Aktivität der viralen Onkogene genutzt (Linxweiler and Schick, 2015). Als HPV-positiv wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tumor mit sowohl positiver PCR als auch dual positivem Ergebnis der p16-Ki67 Immunhistochemie definiert. Ein HPV-positiver Tumor lag demzufolge bei 21 Patienten vor, bei 95 Patienten des Kollektivs konnte keine HPV-Assoziation nachgewiesen werden (Abb. 6). Von den 21 HPV-positiven Tumoren des Kollektivs zählten 20 zum Oropharynx ein HPV-positiver Tumor war ein Larynx-CA. Der durchschnittliche Vitamin-D-Status im Kollektiv sollte so wenig wie möglich durch Schwankungen der Sonnenlichtexposition beeinflusst sein. So wurden Patienten über mehrere Jahre hinweg gleichermaßen in den Winter- (Oktober-März, 48%) und Sommermonaten (April-September, 52%) rekrutiert. Die dabei erfolgte Blutentnahme sollte auf diese Weise möglichst unabhängig von jahreszeitlich schwankenden Vitamin-D-Spiegeln im Blut sein. Des Weiteren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel in Bezug auf den Ernährungszustand (BMI und Serumalbuminwert). Der individuelle Alkoholkonsum der Patienten konnte nicht valide und objektiv beurteilt werden und wurde deswegen in dieser Arbeit nicht bei den statistischen Analysen berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben von Larynx-, Tonsillen-, Hypopharynx-, Zungengrund-, Zungen-, Mundboden-, Weichgaumen-, und Wangenkarzinomen immunhistochemisch ausgewertet (Abb. 7). Als häufigster Subtyp mit 29 Fällen trat dabei das Larynxkarzinom, gefolgt vom Tonsillenkarzinom mit 26 und dem Hypopharynxkarzinom mit 22 Fällen auf. Der seltenste Subtyp mit nur einem Fall war das Wangenkarzinom.

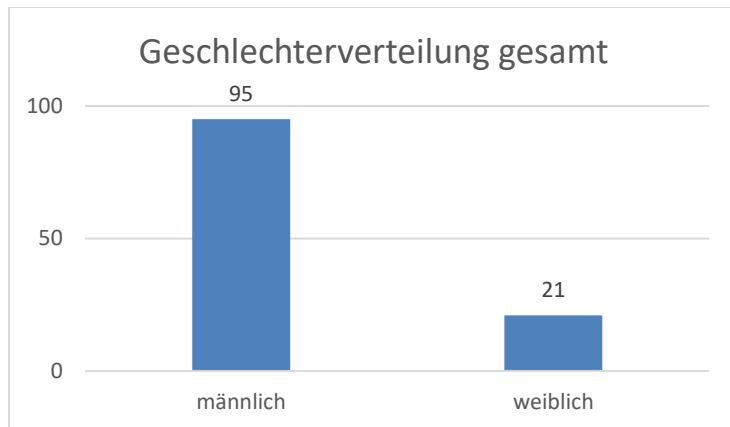


Abbildung 5: Verteilung der Geschlechter des Patientenkollektivs. Darstellung als Säulendiagramm. 95 der 116 Patienten waren männlich, 21 waren weiblich.

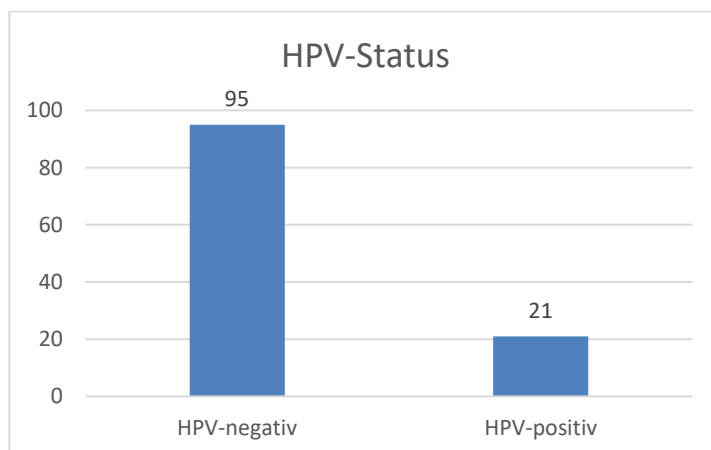


Abbildung 6: HPV-Status-Verteilung des Patientenkollektivs. Darstellung mit Hilfe eines Säulendiagramms. 95 der 116 HNSCC-Patienten waren HPV-negativ, 21 waren HPV-positiv.

4. Ergebnisse

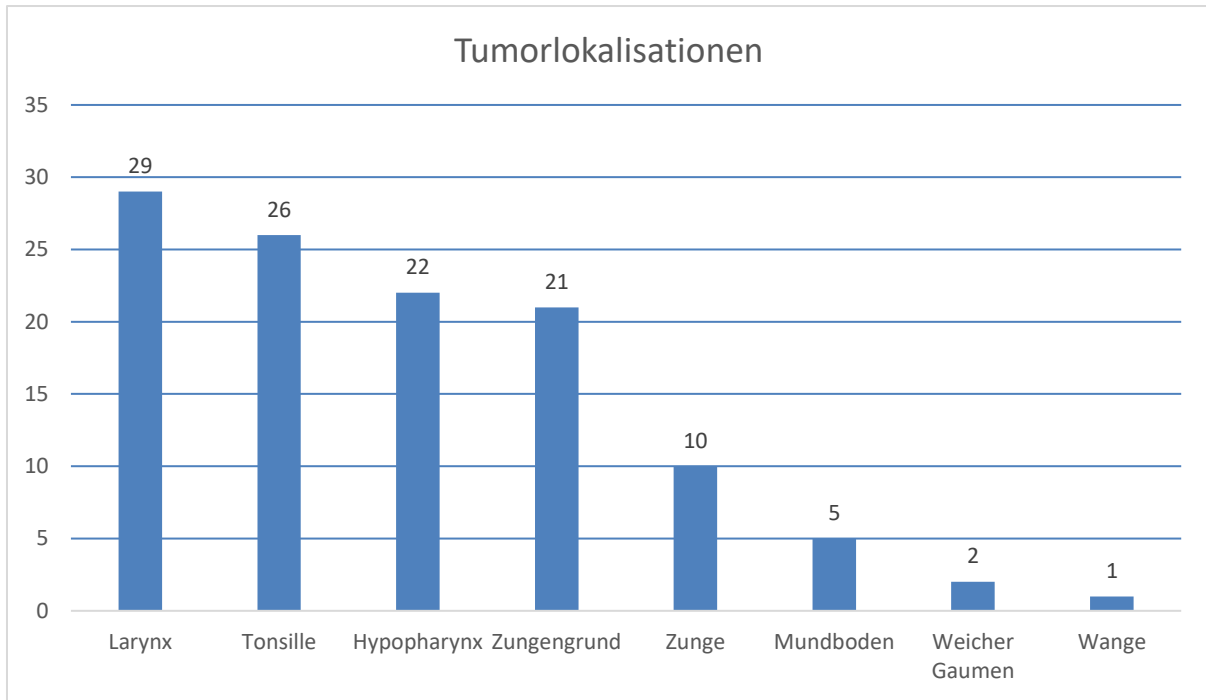


Abbildung 7: Statistische Auswertung der Verteilung der Tumorlokalisation. Darstellung mit Hilfe eines Säulendiagramms. In absteigender Häufigkeit zeigen sich die folgenden Primärtumorlokalisationen: Larynx- (n=29), Tonsillen- (n=26), Hypopharynx- (n=22), Zungengrund- (n=21), Zungen- (n=10), Mundboden- (n=5), Weichgaumen- (n=2) und Wangenkarzinom (n=1).

4.2 Charakterisierung der mikroskopischen Präparate

4.2.1 Präparatgröße, Tumor- und Stromaanteil, Leukozytenzahl, Leukozyteninfiltration

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte HNSCC-Patientenkollektiv aus 116 Patienten gliedert sich in 53 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) und 63 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM). Ein ausreichender Vitamin-D-Serumspiegel wurde auf einen 25-OH-Vitamin-D Wert über 15 ng/ml festgelegt und von einem Vitamin-D-Mangel wurde ab einem 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml gesprochen.

Da sich die Präparate in Bezug auf ihre Größe, den Tumor- beziehungsweise Stromaanteil und die Leukozyteninfiltration unterscheiden, hätte dies die immunhistochemischen Färbeargebnisse potenziell verfälschen können. Zum Umgehen dieses potenziellen Bias in der Auswertung wurden im Voraus in der Dissertationsarbeit „Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich“ von Herrn Dr. med. Benedikt Balensiefer (Universität des Saarlandes, Homburg) diese Präparatecharakteristika für den Großteil der auch in der vorliegenden Arbeit genutzten, mikroskopischen Präparate evaluiert. Das Kollektiv der vorliegenden Arbeit wurde dabei im Vergleich zur damaligen Arbeit (n=103) um 13 Patienten erweitert, wobei die

zusätzlichen Gewebeproben zusätzlich bzgl. der o.g. Parameter in der gleichen Weise wie in der zitierten Dissertationsarbeit beschrieben, analysiert wurden. Die Auswertung der Präparatgröße erfolgte anhand einer Punkteskala von 1 bis 3, wobei kein relevanter Unterschied zwischen den VDM- und VDA-Kollektiven festgestellt werden konnte. Die Präparate hatten in etwa dieselbe Größe und nahmen circa 10 bis 40% der Objektträgeroberfläche für beide Kollektive ein.

Für die Auswertung der Verteilung von Tumor und Stroma in den Präparaten wurde eine kombinierte Skala von 1 bis 4 verwendet, sodass die Summe immer zum Score von 4 (=100% des Präparates) führte. Letztendlich ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den VDA- und VDM-Kollektiven, sodass in Bezug auf die entsprechende Präparatgröße von gleichen Anteilen des Tumors und Stromas ausgegangen werden kann (Abb. 8) (Dr. med. Benedikt Balensiefer, Universität des Saarlandes, Homburg).

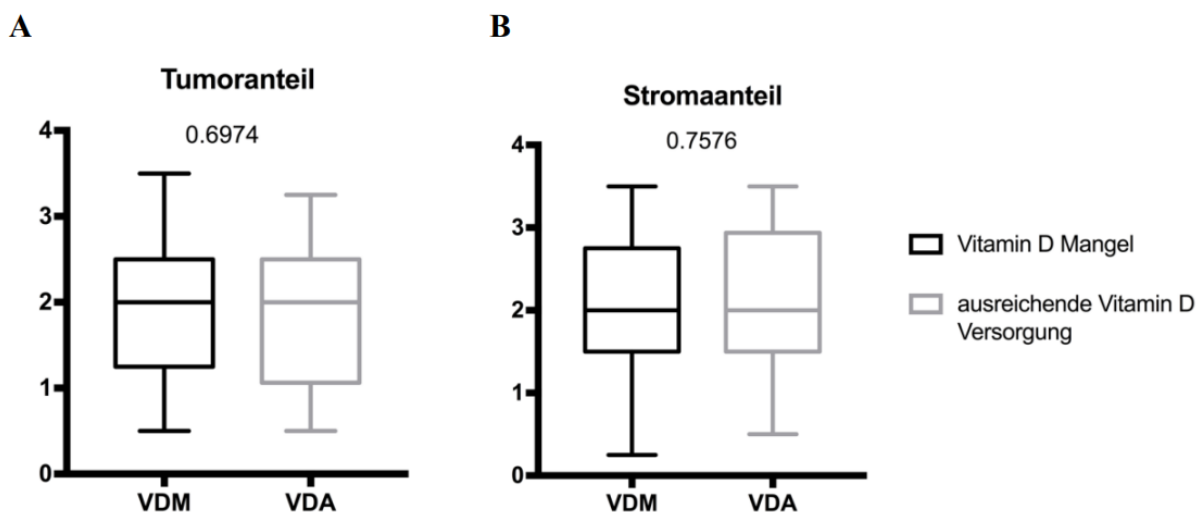


Abbildung 8: Statistische Auswertung des Tumoranteils (A) und des Stromaanteils (B) der Präparate. Die Gewebeanteile wurden anhand einer Skala von 1 bis 4 eingeteilt und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen die 1,5-fache Interquartilsrange (nach Tukey) dar. VDA repräsentiert das Kollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und VDM das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel (Daten in Anlehnung an die Dissertation von Dr. med. Benedikt Balensiefer, 2017).

Im Gegensatz dazu ergab die Auswertung der Leukozytenzahl hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven ($p=0,0001$, Mann-Whitney-U-Test). Es ließen sich bei den VDM-Patienten deutlich weniger Leukozyten als bei den VDA-Patienten nachweisen. Auch die Auswertung der Leukozytenverteilung im Tumor- und Stromagewebe ergab signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p<0,0001$, Mann-Whitney-U-Test). So war bei den VDA-Patienten eine stärkere Leukozyteninfiltration innerhalb des Tumors (intratumorale Leukozyteninfiltration) als bei den VDM-Patienten nachweisbar, während sich wiederum die

4. Ergebnisse

Verteilung im Stroma (peritumorale Leukozyteninfiltration) genau gegensätzlich verhielt. Dort fand man bei den VDM-Patienten signifikant mehr Leukozyten.

4.2.2 Auswertung der T- und N-Stadien

Ein entscheidender prädiktiver Faktor für den Therapieerfolg in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren stellt das Tumorstadium dar. Dieses beeinflusst maßgeblich die Prognose und den jeweiligen Therapieplan. Deswegen wurden die Tumoren des vorliegenden Patientenkollektivs nach ihren T- und N-Stadien ausgewertet und gleichzeitig anhand ihres jeweiligen Vitamin-D-Serumspiegels untereinander verglichen, um so auch die Validität der später beschriebenen Überlebensanalysen zu steigern (Abb. 9 und 10). „T“ steht dabei für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, während „N“ den Lymphknotenbefall näher beschreibt (s. Einleitung). Betrachtete man die T-Stadien, so konnte man im vorliegenden Patientenkollektiv 17 Tumore dem T1-Stadium zuordnen, 48 dem Stadium T2, 27 dem Stadium T3 und 24 dem Stadium T4. Unter den T1-Stadien machten die Vitamin-D-Mangel-Patienten 47,1% aus, 52,1% bei den T2-Stadien, 51,9% bei den T3-Stadien und 66,7% bei den T4-Stadien. Auf der anderen Seite gehörten 52,9% der T1-Stadien, 47,9% der T2-Stadien, 48,1% der T3 und 33,3% der T4-Stadien zu denjenigen Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Daraus ergibt sich eine leichte Tendenz zu eher höheren T-Stadien bei den Vitamin-D-Mangel-Patienten (Abb. 9), wobei der Unterschied dieser Verteilung nicht statistisch signifikant war.

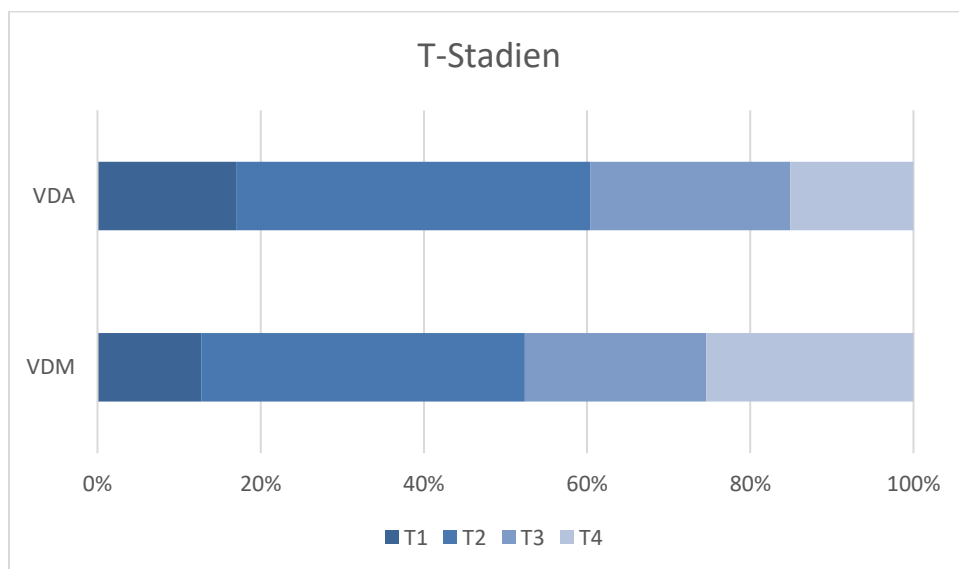


Abbildung 9: Statistische Auswertung des T-Stadiums der HNSCC-Patienten. Darstellung der T-Stadien in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status mit Hilfe eines Balkendiagramms. Jeder Balken repräsentiert dabei einen eigenen prozentualen Anteil an den T-Stadien. Es wurde außerdem zwischen Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel (VDA) und Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) unterschieden.

Unter den N-Stadien ließen sich 37 Patienten dem N0-Stadium, 17 Patienten dem N1-, 55 Patienten dem N2- und 7 Patienten dem N3-Stadium zuordnen. Dabei betrug der Anteil der Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel unter den N0-Stadien 51,4%, unter den N1-Stadien 52,9%, unter den N2-Stadien 43,6% und unter den N3-Stadien 14,3%. Der Anteil der Vitamin-D-Mangel-Patienten betrug unter den N0-Stadien 48,6%, unter den N1-Stadien 47,1%, unter den N2-Stadien 56,4% und unter den N3-Stadien 85,7% (Abb. 10). Wie auch bei den T-Stadien, lässt sich eine Tendenz hin zu höheren N-Stadien unter den Vitamin-D-Mangel-Patienten beobachten, ohne dass ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

Da sich im gesamten Patientenkollektiv dieser Arbeit lediglich 6 Patienten mit Fernmetastasen (M1) bei Erstdiagnose zeigten, wurde auf eine gesonderte statistische Auswertung der M-Stadien bewusst verzichtet.

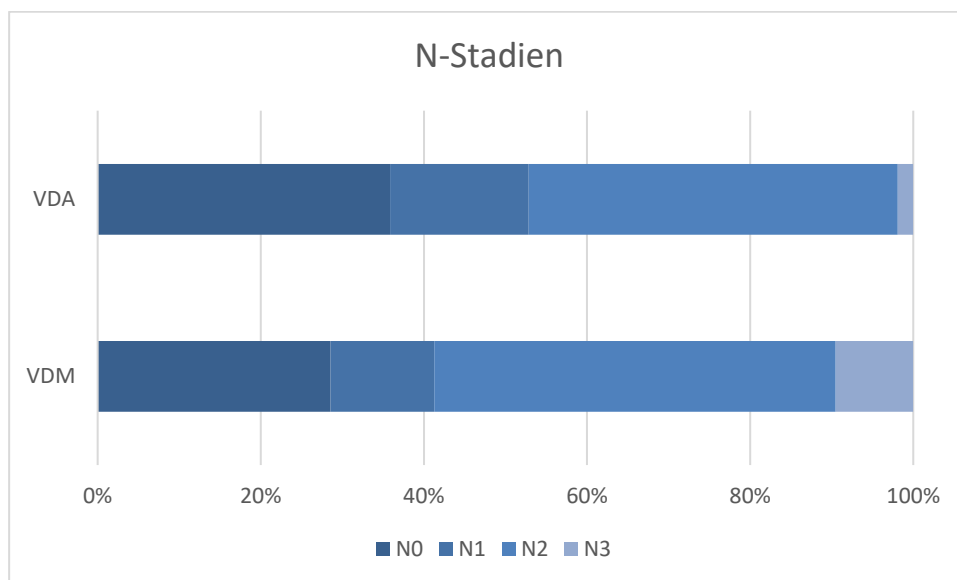


Abbildung 10: Statistische Auswertung der N-Stadien der HNSCC-Patienten. Darstellung der N-Stadien in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status mit Hilfe eines Balkendiagramms. Jeder Balken repräsentiert dabei einen eigenen prozentualen Anteil an den N-Stadien. Es wurde außerdem zwischen Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel (VDA) und Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel unterschieden.

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Wie im Material und Methoden Teil beschrieben wurden mikroskopische Schnittpräparate von 116 Patienten immunhistochemisch gefärbt. So sollte der Einfluss von Vitamin-D auf die Zusammensetzung regulatorischer Populationen tumorinfiltrierender Leukozyten und deren Effektormoleküle durch den immunhistochemischen Nachweis im Tumorgewebe überprüft werden. Während der CD20-Antikörper dem B-Zell Nachweis diente, galten die anderen Antikörper vornehmlich der Detektion bestimmter T-Zell-Populationen bzw. Aktivitätsstadien.

4. Ergebnisse

Der Antikörper gegen FoxP3 repräsentierte besonders den Nachweis regulatorischer T-Zellen, der Antikörper gegen FasL den zytotoxischen T-Zell- und NK-Zell-Nachweis, der IL10-Antikörper den TH- und T^{REG}-Zell-Nachweis und der CTLA4-Antikörper den zytotoxischen und regulatorischen T-Zell-Nachweis. Dabei wurde jeweils zwischen dem Nachweis der Moleküle in intra- und peritumoral lokalisierten Leukozyten, sowie bei FasL und IL10 auch zwischen den löslichen und lokalisierten Formen der Moleküle unterschieden. Die semiquantitative Auswertung erfolgte anhand des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (Remmele & Stegner 1987). Dabei wurde die antikörperspezifische Färbeintensität (0-3) mit der Anzahl positiver Zellen (0-4) multipliziert. Für die Antikörper gegen CD20 und FoxP3 wurde dieser Score modifiziert, um das in der Literatur bereits beschriebene homogenere Expressionsprofil zu berücksichtigen, sodass sich ein modifizierter Immunreaktiver Score ergab (mIRS). Beim mIRS wurde die absolute Anzahl der im gesamten Präparat vorhandenen Leukozyten (0-3) mit der relativen Anzahl der davon gefärbten Immunzellen (0-4) multipliziert. Nachfolgend werden nun die Ergebnisse der einzelnen Färbungen dargestellt und beschrieben.

4.3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD20 an HNSCCs

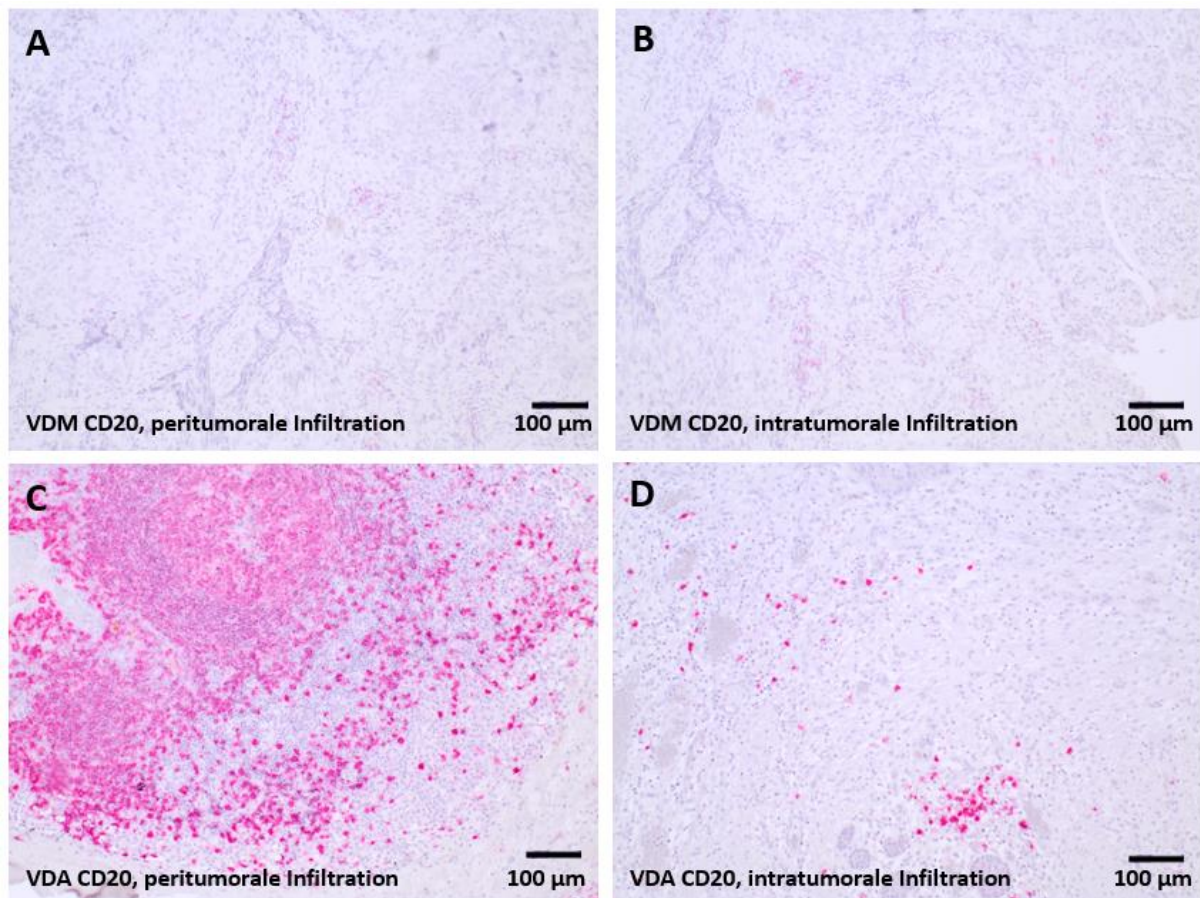


Abbildung 11: Immunhistochemische Detektion von CD20⁺-B-Zellen an HNSCC-Tumorproben. Dargestellt sind in der oberen Reihe HNSCC-Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM), sowie darunter Proben von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Verglichen werden außerdem die intratumorale sowie die peritumorale B-Zell-Infiltration. Antikörper spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.

Abbildung 11 stellt repräsentativ das Färbeverhalten von CD20⁺-B-Zellen in HNSCC-Tumorpräparaten dar. Dabei wurde exemplarisch in der unteren Reihe das Färbeergebnis eines Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und in der oberen Reihe das von einem Vitamin-D-Mangel-Patienten dargestellt. Weiterhin werden jeweils auf der linken Seite die peritumoralen Leukozyten und auf der rechten Seite die intratumoralen Leukozyten dargestellt. Die CD20-Oberflächenexpression auf den B-Zellen ist hierbei an einem intensiv roten, distinkten Färbesignal zu erkennen. In Abbildung 11 wird deutlich, dass der Vitamin-D-Mangel Patient sowohl peri- als auch intratumoral deutlich weniger gefärbte Leukozyten aufweist als der VDA-Patient.

Die statistische Auswertung der tumoralen Infiltration CD20 exprimierender Zellen des gesamten Patientenkollektivs ist in Abbildung 12 dargestellt und unterstreicht die

4. Ergebnisse

beobachtete Tendenz der beispielhaft ausgewählten Patienten aus Abbildung 11. Die linke Seite des Schaubilds veranschaulicht die Infiltration der CD20⁺-B-Zellen im peritumoralen Gewebe, während auf der rechten Seite nur die intratumorale Infiltration dargestellt ist. Die ausgefüllten Kreise stehen für Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel, die in der Mitte weißen Kreise repräsentieren die Vitamin-D-Mangel-Patienten. Auf der Y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score skaliert.

Bei den VDA-Patienten war peritumoral, verglichen mit den VDM-Patienten, eine deutliche, jedoch nicht signifikante Tendenz zu einer gesteigerten Infiltration CD20-exprimierender Leukozyten ($p = 0,0662$) erkennbar. Der mIRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumorale Infiltration 4,887 (Standardfehler 3,165) und im VDA-Kollektiv 6,088 (Standardfehler 3,653). Der Median lag unter den VDM-Patienten bei 5 und unter den VDA-Patienten bei 7. Intratumoral ließ sich sogar ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen ($p = 0,0289$), mit einer positiven Korrelation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und der intratumoralen Infiltration CD20-exprimierender Immunzellen. Der mIRS-Mittelwert lag hierbei im VDM-Kollektiv bei 1,411 (Standardfehler 1,196) und im VDA-Kollektiv bei 2,667 (Standardfehler 2,681). Der mIRS-Median für die intratumorale Infiltration mit CD20⁺ Immunzellen lag unter den VDA-Patienten bei 1,5 und bei den VDM-Patienten bei 11.

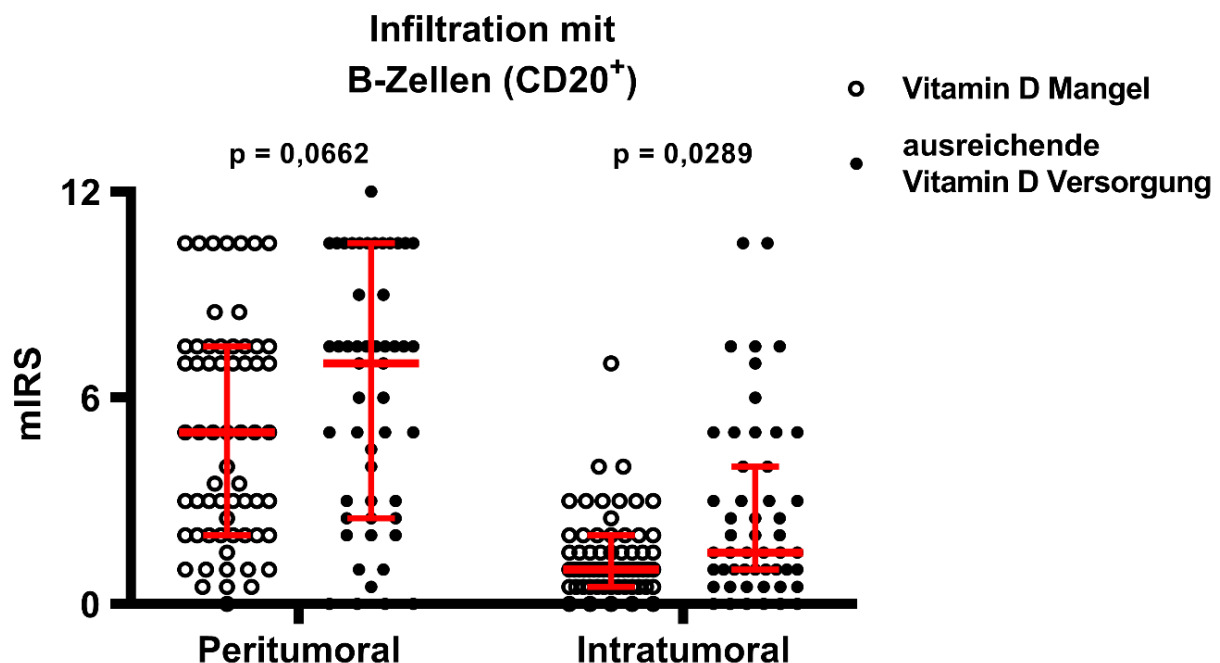


Abbildung 12: Statistische Auswertung der leukozytären Expression von CD20 im peri- und intratumoralen Gewebe im Verhältnis zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe eines modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS) konnte die CD20-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen mIRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich

wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

4.3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CTLA4 an HNSCCs

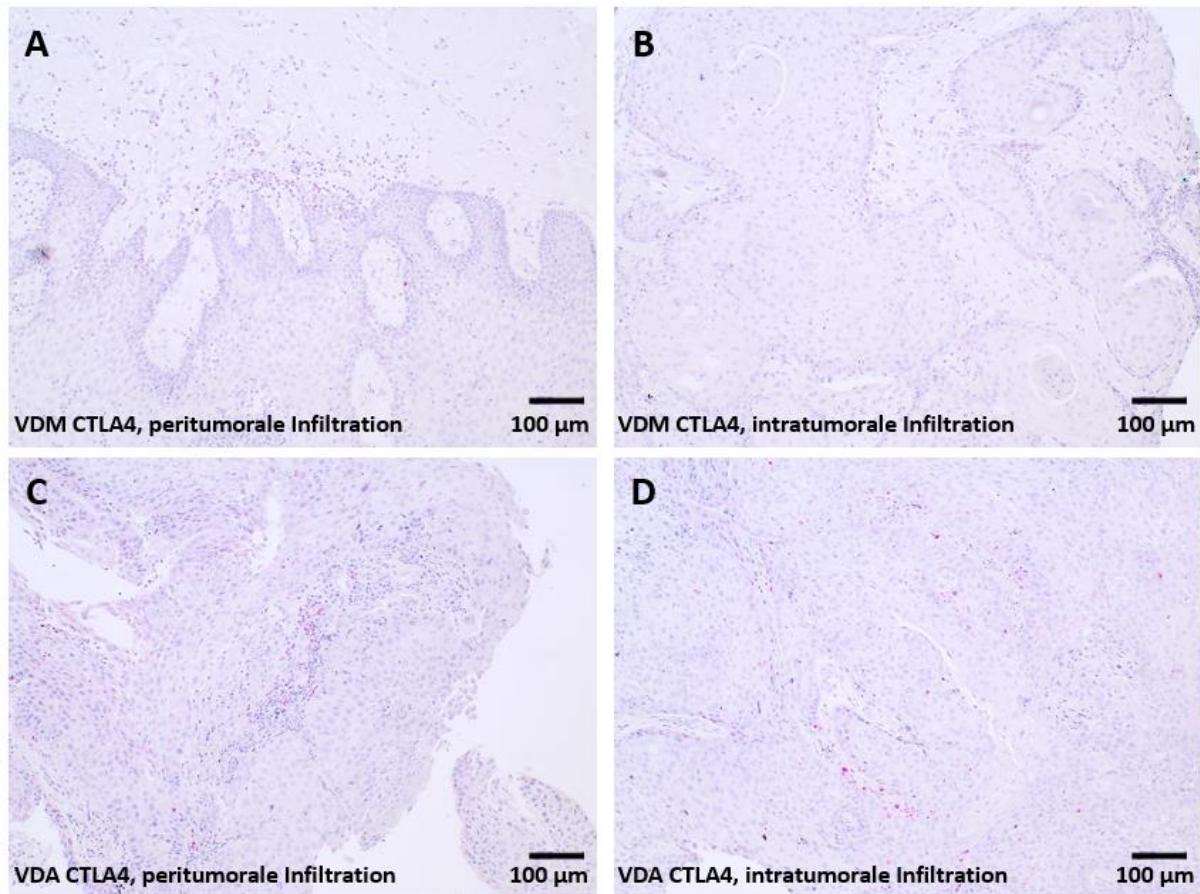


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von CTLA4⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorpräparaten. Dargestellt sind repräsentativ in der oberen Reihe zwei HNSCC-Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM), sowie darunter Proben von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Verglichen wurden zusätzlich die intratumorale sowie die peritumorale Infiltration. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt

Abbildung 13 stellt repräsentativ das Färbeverhalten von CTLA4⁺-Leukozyten in HNSCC-Tumorpräparaten dar. Dabei wurde exemplarisch in der unteren Reihe das Färbeergebnis eines Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und in der oberen Reihe das von einem Vitamin-D-Mangel-Patienten dargestellt. Weiterhin wird von links nach rechts die peri- und intratumorale Infiltration unterschieden. Man kann erkennen, dass das Färbebild des Vitamin-D-Mangel-Patienten tendenziell weniger gefärbte Zellen als das des VDA-

4. Ergebnisse

Patienten zeigt, wenn auch insgesamt verglichen mit den zuvor dargestellten Ergebnissen für die CD20-IHC deutlich weniger positiv gefärbte Immunzellen detektiert werden konnten.

Die statistische Auswertung der CTLA4-Expression der infiltrierenden Leukozyten ist in Abbildung 14 dargestellt und zeigt entsprechend der Tendenz der Färbebilder aus Abbildung 13 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Kollektiven. Der IRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumorale Infiltration 1,871 (Standardfehler 2,070) und im VDA-Kollektiv 1,971 (Standardfehler 2,270). Intratumoral lag der IRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 1,169 (Standardfehler 1,194) und im VDA-Kollektiv bei 1,212 (Standardfehler 1,805). Der IRS-Median peritumoral und intratumoral lag für das VDM-Kollektiv ebenso wie für das VDA-Kollektiv bei 1. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich konnte auch keine wesentliche Tendenz hin zu einer stärkeren Infiltration mit CTLA4+ Immunzellen in einem der beiden Kollektiven ausgemacht werden.

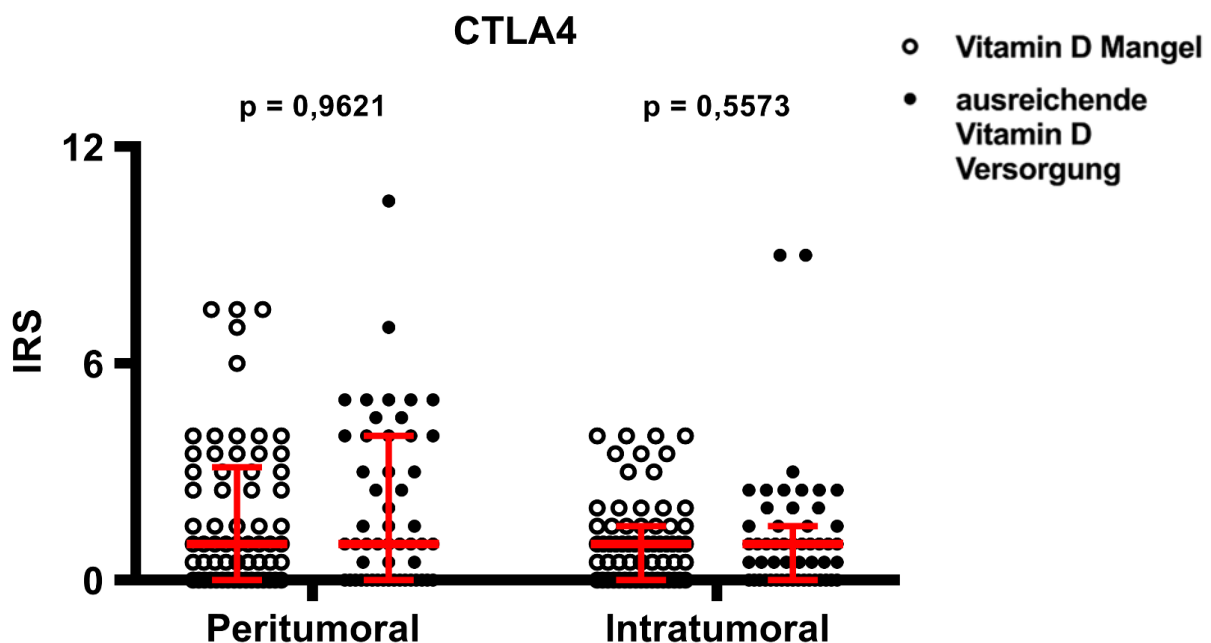


Abbildung 14: Statistische Auswertung der CTLA4-Expression der infiltrierenden Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die CTLA4-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

4.3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von FasL an HNSCCs

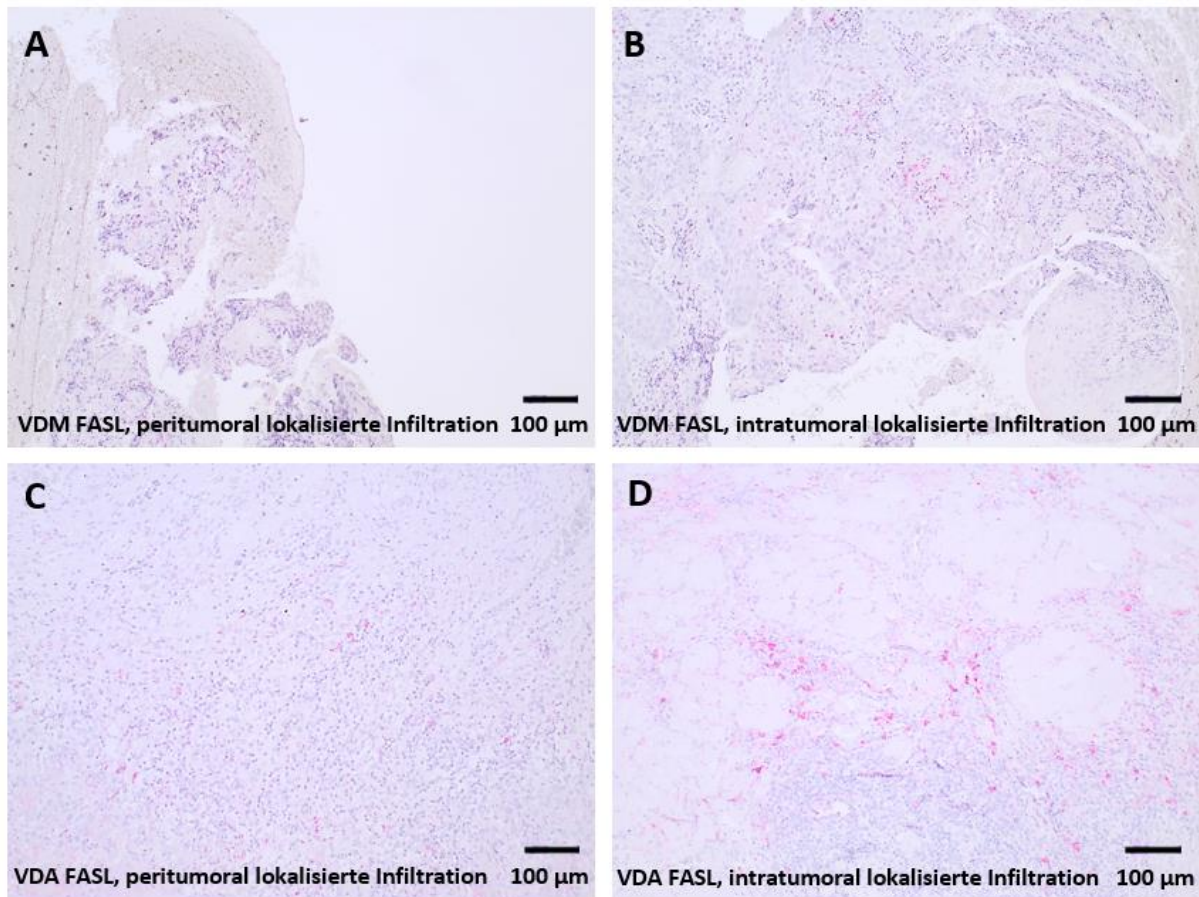


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung mFasL⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, stellen die unteren beiden Präparate die Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status dar. Zusätzlich wird von links nach rechts die peritumoral lokalisierte von der intratumoral lokalisierten Form unterschieden. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.

4. Ergebnisse

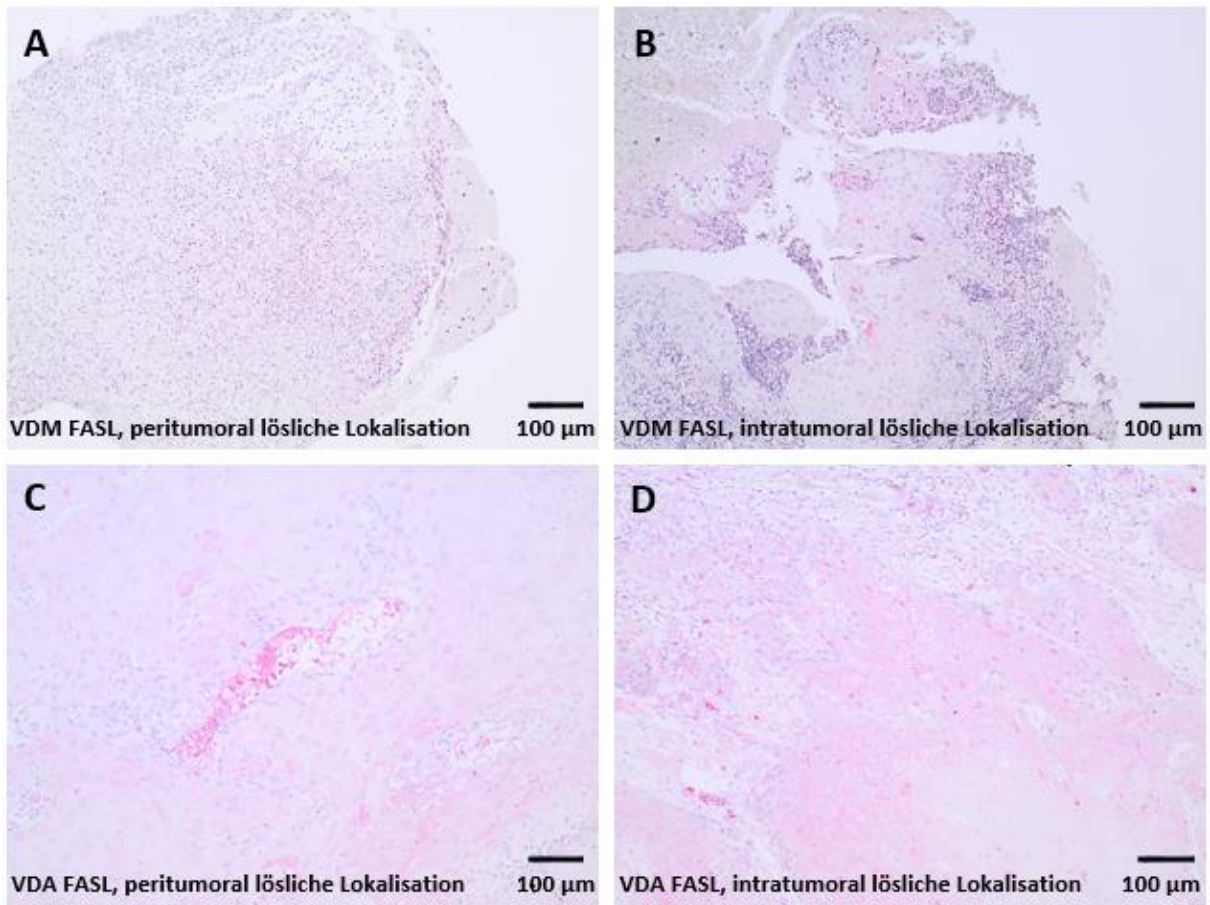


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung des löslichen FasL an HNSCC-Tumorproben. Verglichen werden repräsentativ die Expression des löslichen FasL peri- und intratumoral bei einem Vitamin-D-Mangel-Patienten (VDM) und einem Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt. 100-fache Vergrößerung.

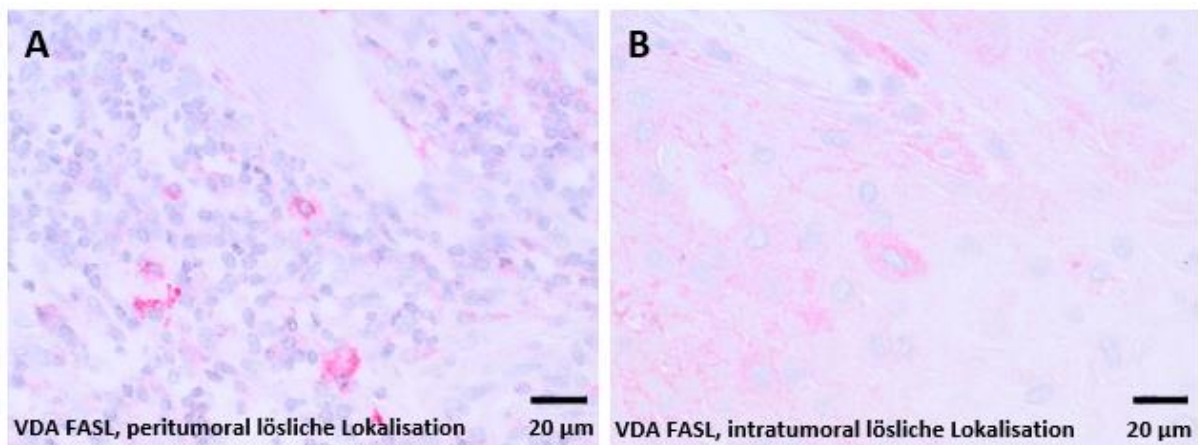


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung des löslichen FasL an HNSCC-Tumorproben. Vergleich der peritumoralen und intratumoralen Expression von löslichem FasL bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung in 500-facher Vergrößerung.

Abbildung 15 stellt repräsentativ das Färbeverhalten von mFasL⁺-Leukozyten in HNSCC-Tumorpräparaten dar, die Abbildungen 16 und 17 die lösliche, proteolytisch entstandene Form des Fas-Liganden (sFasL). Dabei wurde in Abbildung 15 und 16 exemplarisch in der unteren Reihe das Färbeergebnis eines Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und in der oberen Reihe das von einem Vitamin-D-Mangel-Patienten dargestellt. Weiterhin wird von links nach rechts die peri- und intratumorale Lokalisation der jeweils betrachteten Leukozyten unterschieden. Man kann erkennen, dass das Färbepild der Vitamin-D-Mangel-Patienten in geringer Tendenz weniger gefärbte Zellen und einen schwächeren Nachweis des löslichen Fas-Liganden im Vergleich zu den VDA-Patienten zeigt.

Die statistische Auswertung der Lokalisation FasL-exprimierender Zellen ist in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt und zeigt entsprechend der beobachteten Tendenz der Einzelfall-Färbepilder keine signifikanten Ergebnisse. Anhand der p-Werte des Vergleichs der beiden Kollektive intra- und peritumoral, sowohl für die lösliche als auch die membrangebundene lokalisierte Form, ließ sich letztlich kein signifikanter Unterschied feststellen. Der IRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumoral lokalisierte (membrangebundene) Form 6,411 (Standardfehler 3,376) und im VDA-Kollektiv 6,423 (Standardfehler 2,745). Für die intratumoral lokalisierte Form lag der IRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 2,839 (Standardfehler 1,835) und im VDA-Kollektiv bei 2,404 (Standardfehler 1,325). Der Median lag peritumoral lokalisiert im VDM-Kollektiv bei 6,5 und im VDA-Kollektiv bei 7, intratumoral lokalisiert bei VDM-Patienten bei 2 und bei VDA-Patienten bei 2,5.

Der IRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumoral lösliche FasL-Form 3,210 (Standardfehler 2,291) und im VDA-Kollektiv 3,163 (Standardfehler 2,287). Für die intratumoral lösliche FasL-Form lag der IRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 3,387 (Standardfehler 2,185) und im VDA-Kollektiv bei 3,5 (Standardfehler 2,648). Der Median lag für die peritumoral lösliche FasL-Form im VDM- und VDA-Kollektiv bei 2,5, für die intratumoral lösliche FasL-Form bei den VDM-Patienten bei 3 und bei den VDA-Patienten bei 2,5.

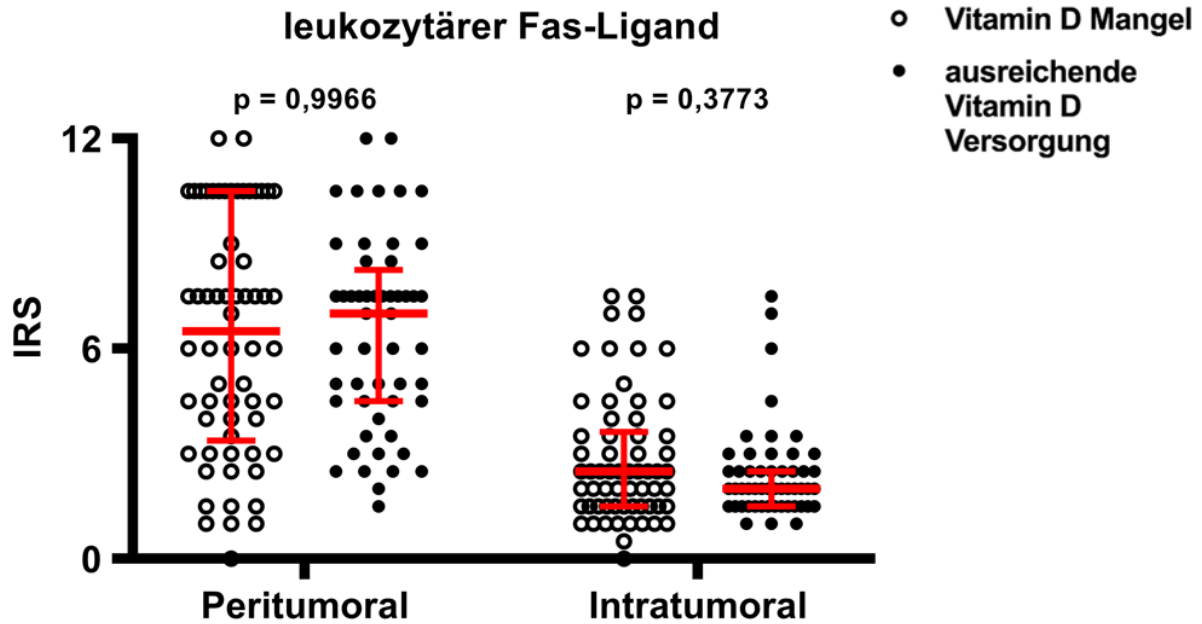


Abbildung 18: Statistische Auswertung der Infiltration mFasL exprimierender Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die mFasL-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

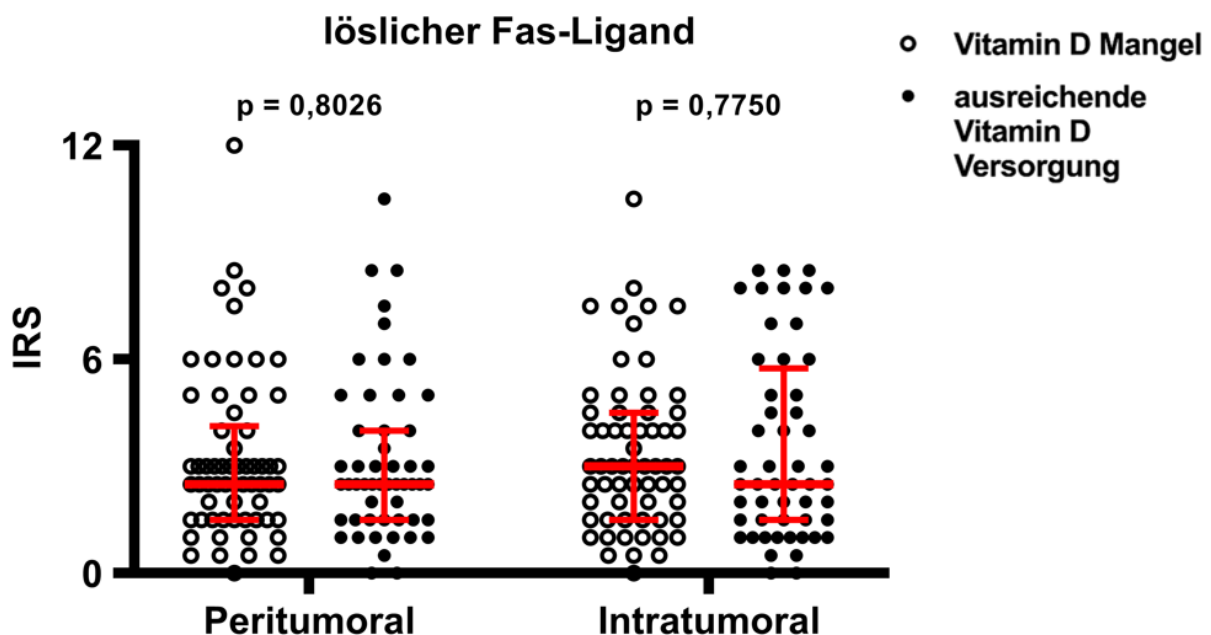


Abbildung 19: Statistische Auswertung der Lokalisation des löslichen FasL im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die sFasL-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch

dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

4.3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von FoxP3 an HNSCCs

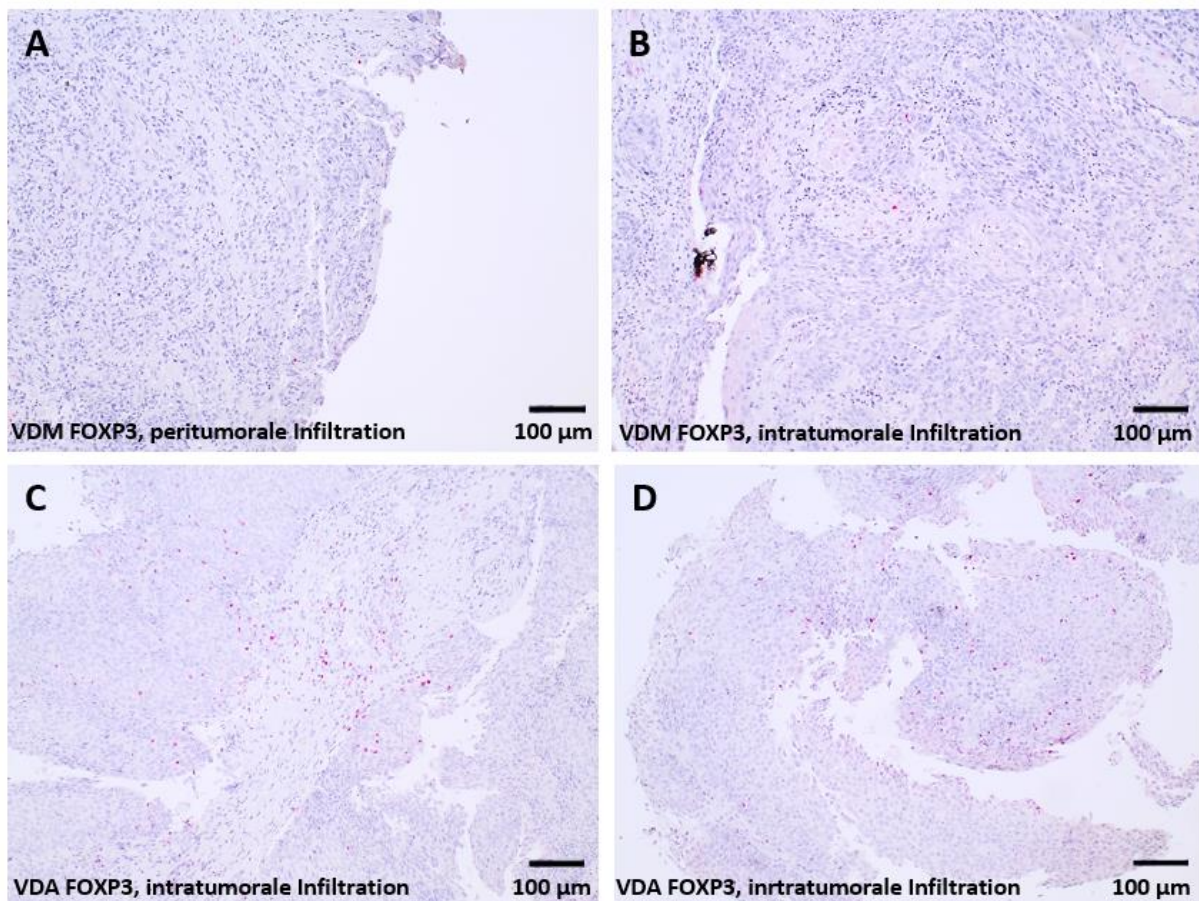


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung FoxP3⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, stellen die unteren beiden Präparate Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status dar. Zusätzlich wird von links nach rechts das peritumorale vom intratumoralen Färbeverhalten unterschieden. Antikörperspezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.

Abbildung 20 stellt repräsentativ das Färbeverhalten FoxP3⁺-regulatorischer-T-Zellen in HNSCC-Tumorpräparaten dar. Dabei wurde exemplarisch in der unteren Reihe das Färbeergebnis eines Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und in der oberen Reihe das von einem Vitamin-D-Mangel-Patienten dargestellt. Weiterhin wird von links nach rechts die peri- und intratumorale Infiltration unterschieden. Die nukleäre FoxP3-Expression erkennt man an dem intensiv roten, distinkten Färbesignal der Zellkerne der

4. Ergebnisse

entsprechenden Leukozyten. Man kann erkennen, dass das Färbepild des Vitamin-D-Mangel Patienten tendenziell weniger gefärbte Zellen als das des VDA-Patienten zeigt.

Die statistische Auswertung der Infiltration FoxP3 exprimierender Zellen ist in Abbildung 21 dargestellt und zeigte entgegen der beobachteten Tendenz der in Abbildung 20 dargestellten Färbepilder keine signifikanten Unterschiede zwischen dem VDA- und dem VDM-Kollektiv. Der mIRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumorale Infiltration 3,008 (Standardfehler 2,277) und im VDA-Kollektiv 2,865 (Standardfehler 2,314). Der mIRS-Median lag peritumoral im VDM-Kollektiv und VDA-Kollektiv bei 2,5. Intratumoral lag der mIRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 1,484 (Standardfehler 1,152) und im VDA-Kollektiv bei 1,577 (Standardfehler 1,3). Der mIRS-Median intratumoral lag unter den VDM-Patienten bei 1 und bei den VDA-Patienten bei 1,25.

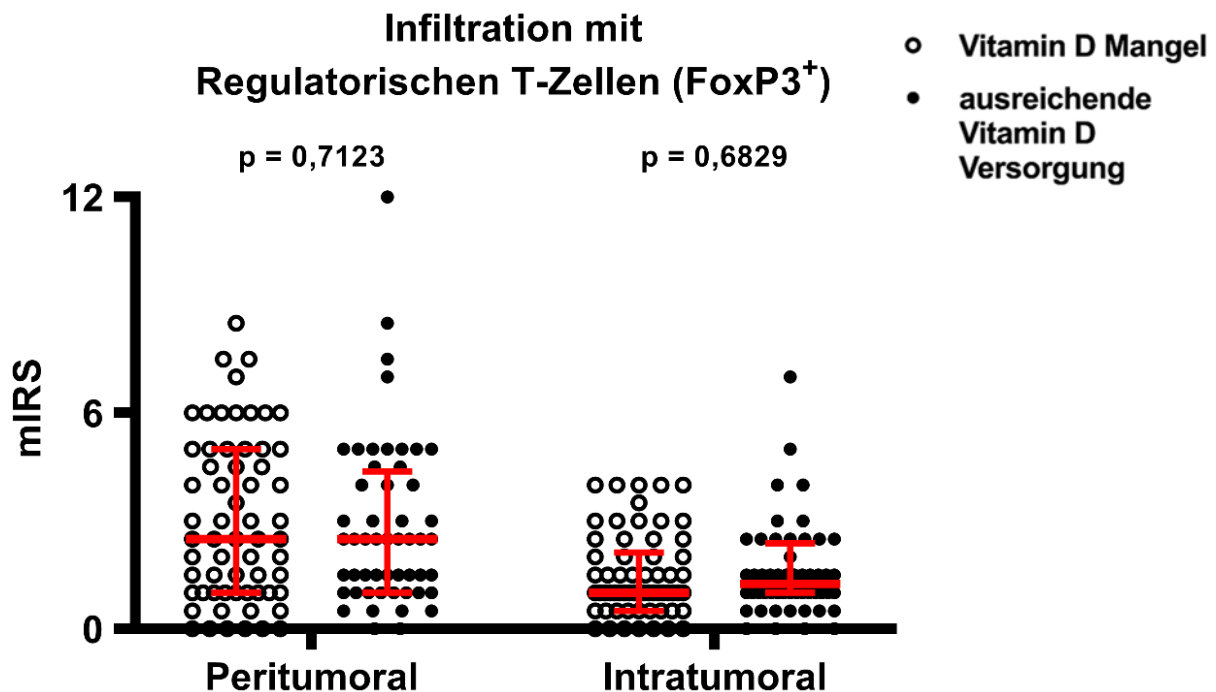


Abbildung 21: Statistische Auswertung der FoxP3-Expression tumorassoziierter Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe eines modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS) konnte die FoxP3-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

4.3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von IL10 an HNSCCs

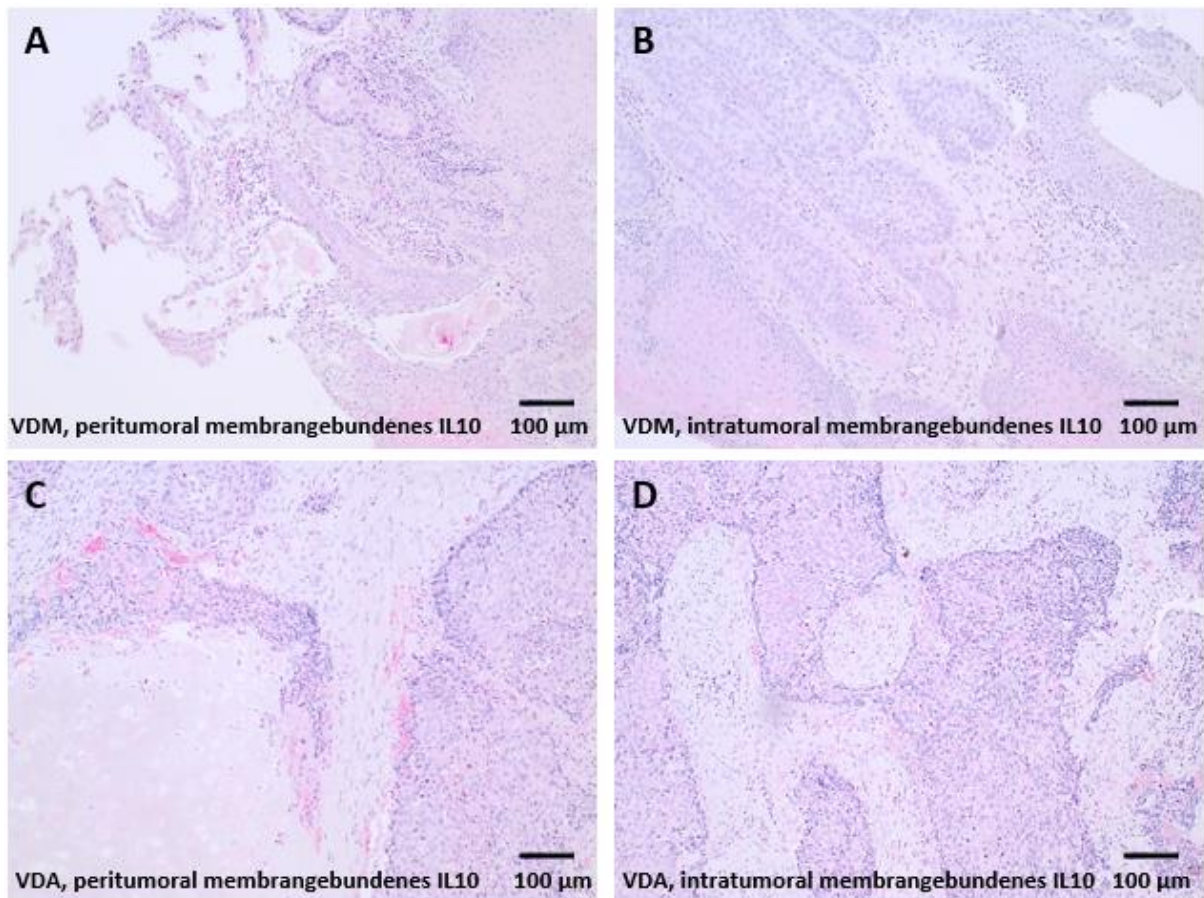


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von membrangebundenem IL10 an Leukozyten in HNSCC-Tumorproben. Verglichen werden repräsentativ die lokalisierten Färbeformen im peritumoralen Gewebe, sowie jene intratumoral. Die oberen beiden Bilder stellen Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) dar, während die untere Reihe Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status (VDA) zeigt. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.

4. Ergebnisse

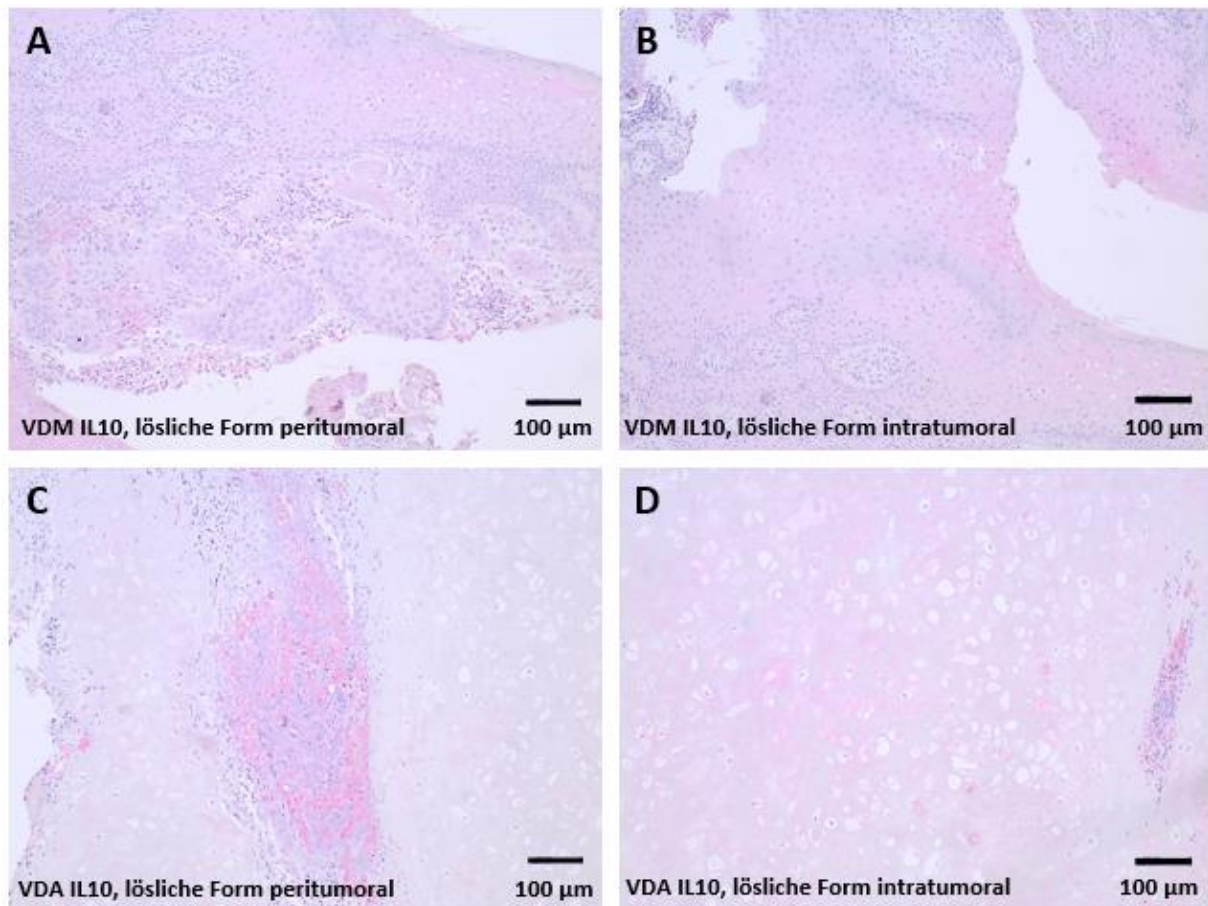


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung des löslichen IL10 an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, gehören die unteren beiden Präparate zu einem Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status. Es wird zusätzlich von links nach rechts zwischen der sezernierten Färbeform intra- und peritumoral unterschieden. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.

Die Abbildungen 22 und 23 stellen repräsentativ das Färbeverhalten IL10-exprimierender und sezernierender Leukozyten in HNSCC-Tumorpräparaten dar. Dabei wurde in den beiden Abbildungen exemplarisch in der unteren Reihe das Färbeergebnis eines Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und in der oberen Reihe das von einem Vitamin-D-Mangel-Patienten dargestellt. Weiterhin wird von links nach rechts das peri- und intratumorale Färbesignal unterschieden. Man kann erkennen, dass das Färbeverhalten der Vitamin-D-Mangel Patienten kaum Unterschiede im Vergleich zu den VDA-Patienten zeigt.

Die statistische Auswertung der leukozytären IL10-Expression in Abbildung 24 und 25 dargestellt und zeigt entsprechend der beobachteten Tendenz der beispielhaft dargestellten Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem VDA- und dem VDM-Kollektiv. Der IRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumorale Lokalisation von membrangebundenem IL10 1,847 (Standardfehler 1,398) und im VDA-Kollektiv 1,558 (Standardfehler 0,9983). Für die intratumorale Lokalisation von membrangebundenem IL10

lag der IRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 1,565 (Standardfehler 0,9342) und im VDA-Kollektiv bei 1,519 (Standardfehler 0,7407). Der Median lag peritumoral und intratumoral für die membrangebundene IL10-Form im VDM- sowie VDA-Kollektiv bei 1,5.

Der IRS-Mittelwert der VDM-Patienten betrug für die peritumorale Lokalisation von löslichem IL10 1,46 (Standardfehler 1,262) und im VDA-Kollektiv 1,269 (Standardfehler 1,059). Für die intratumoral lösliche IL10-Form lag der IRS-Mittelwert im VDM-Kollektiv bei 2,218 (Standardfehler 1,909) und im VDA-Kollektiv bei 2,288 (Standardfehler 1,786). Der Median lag für die peritumorale lösliche IL10-Form im VDM-Kollektiv bei 1,25 und im VDA-Kollektiv bei 1, für die intratumorale lösliche IL10-Form bei den VDM-Patienten bei 1,5 und bei den VDA-Patienten bei 2.

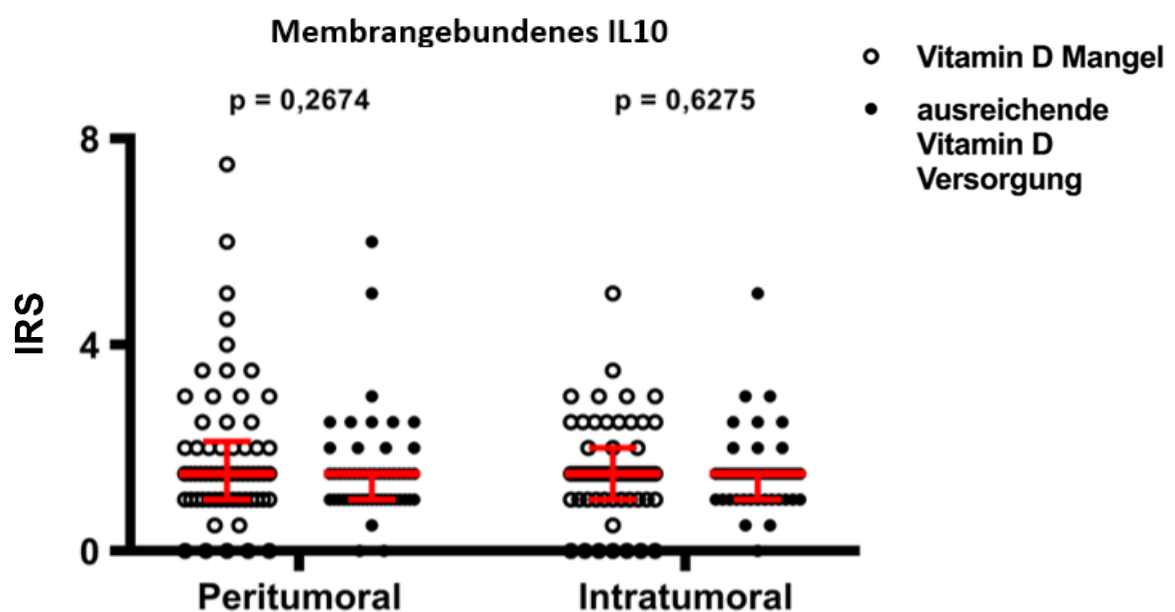


Abbildung 24: Statistische Auswertung der Infiltration IL10 exprimierender Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die IL10-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

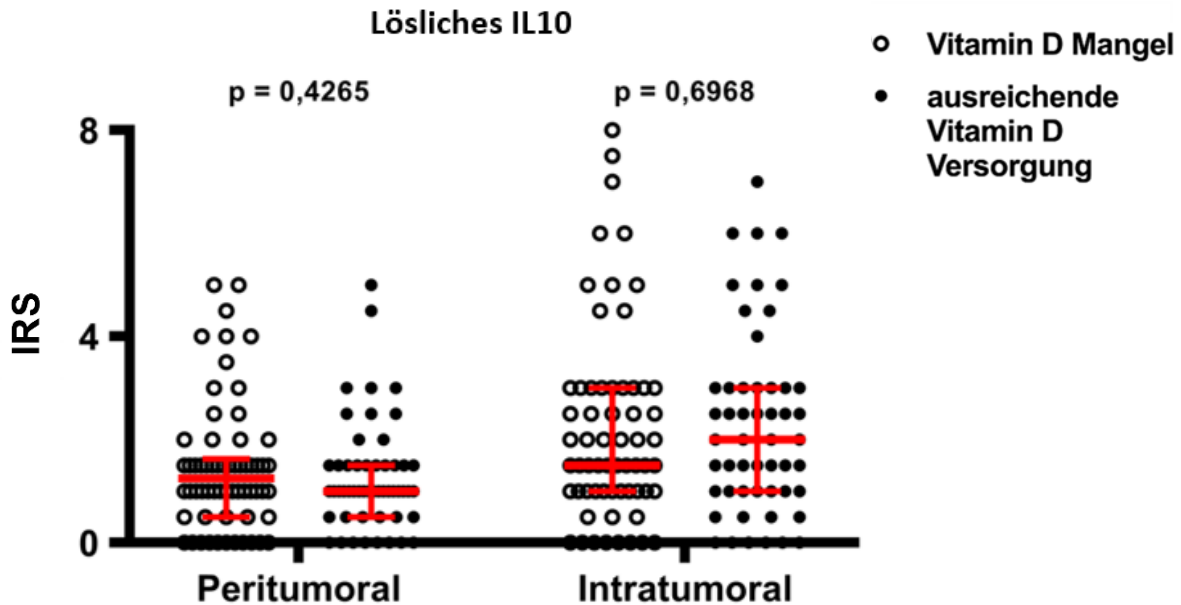


Abbildung 25: Statistische Auswertung der Expression des löslichen IL10 im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die IL10-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median, der untere bis zum oberen Whisker das Minimum bis zum Maximum. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.

4.4 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Zusammenfassend zeigten besonders die statistischen Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen von CD20⁺-B-Zellen an HNSCCs eine signifikante Steigerung der intratumoralen Infiltration bei Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel. Auch die Analyse der peritumoralen Infiltration mit CD20⁺-Leukozyten zeigte eine deutliche Tendenz hin zu einer gesteigerten Infiltration im VDA-Kollektiv. Keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status ergaben die Analysen von CTLA4, FasL, FoxP3 und IL10.

4.5 Überlebensanalysen

4.5.1 Überlebensanalyse abhängig vom Vitamin-D-Status

Die in Abbildung 26 dargestellte Kaplan-Meyer-Analyse des Gesamtüberlebens im Vergleich zwischen dem VDA- und dem VDM-Kollektiv zeigt eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens von HNSCC-Patienten bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung

($p=0,0233$). Bei diesen lag das mediane Überleben bei 27 Monaten. Die Vitamin-D-Mangel Patienten wiesen eine Hazard Ratio für die Gesamtsterblichkeit von 1,964 auf, während sie bei den ausreichend mit Vitamin-D versorgten Patienten bei 0,509 lag. Somit ergibt sich ein um ca. 150 % erhöhtes Sterberisiko der Kopf-Hals-Tumorpatienten mit einem Vitamin-D-Mangel verglichen mit den Patienten, die eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung aufgewiesen hatten. Das Follow-Up der Patienten des VDA-Kollektivs betrug maximal 8 Jahre und 5 Monate (minimal 2 Monate bei dann eingetretenem Tod), das Follow-Up der VDM- Patienten 4 Jahre und 7 Monate (minimal 4 Monate bei dann eingetretenem Tod).

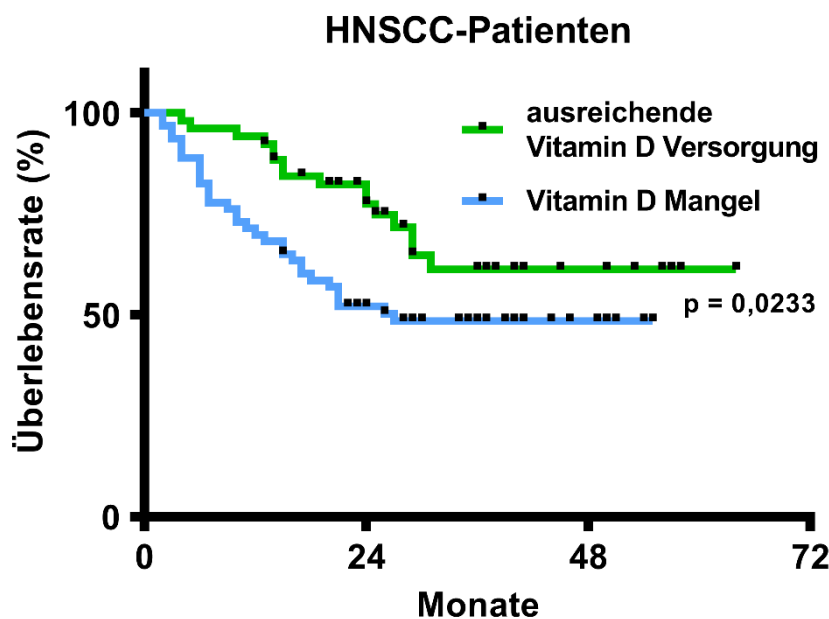


Abbildung 26: Einfluss des Vitamin-D-Status auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten. Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve für das Patientenkollektiv in Abhängigkeit, ob ein Patient einen Vitamin-D-Mangel oder eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung aufwies. Schwarze Punkte symbolisieren zensierte Daten.

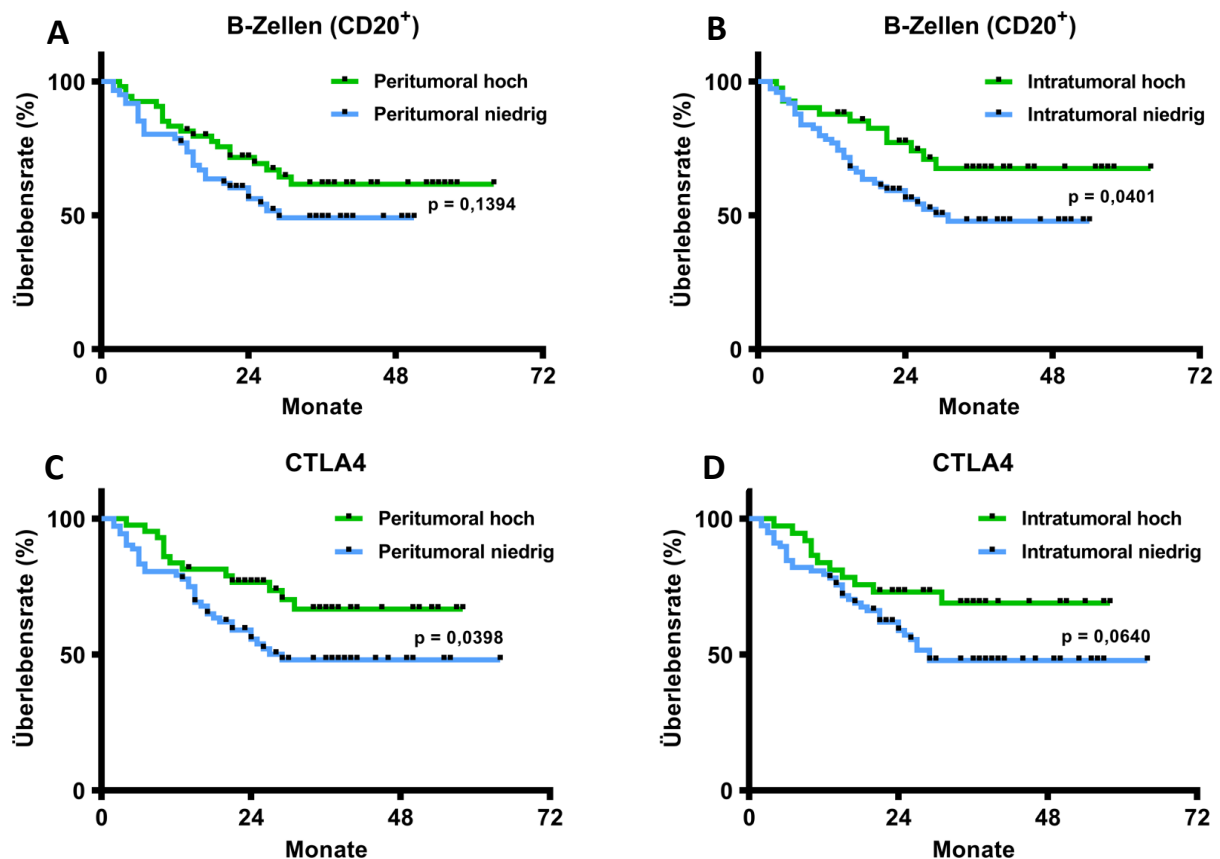
4.5.2 Überlebensanalysen abhängig von den immunhistochemisch analysierten Leukozyten-Markern

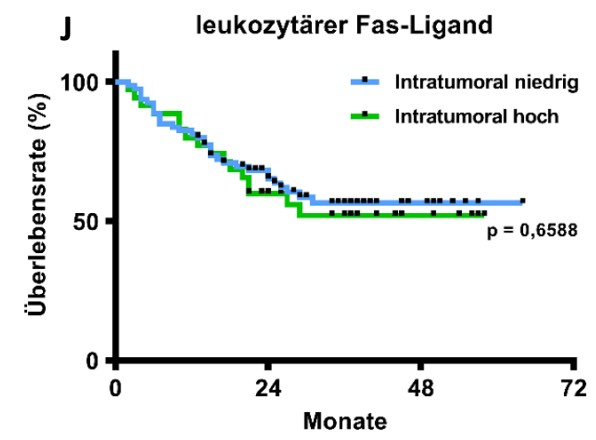
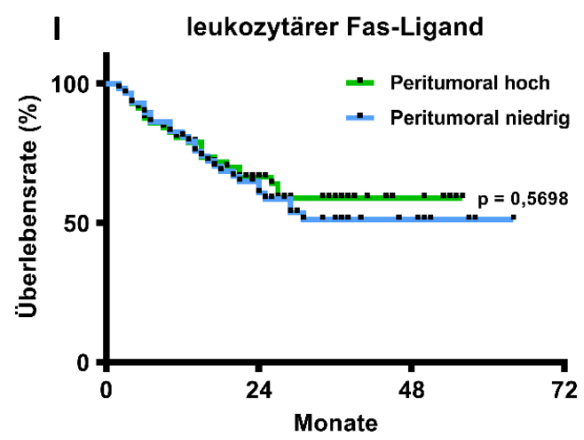
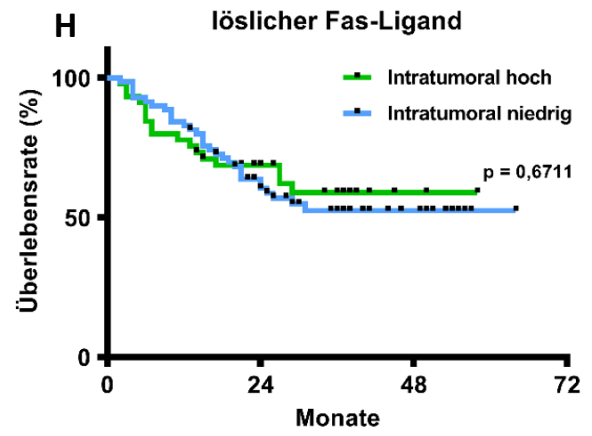
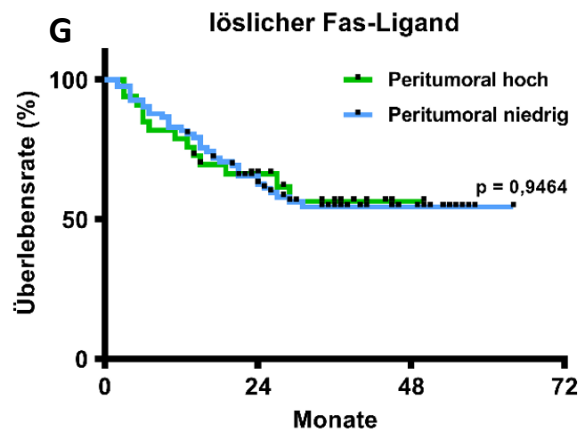
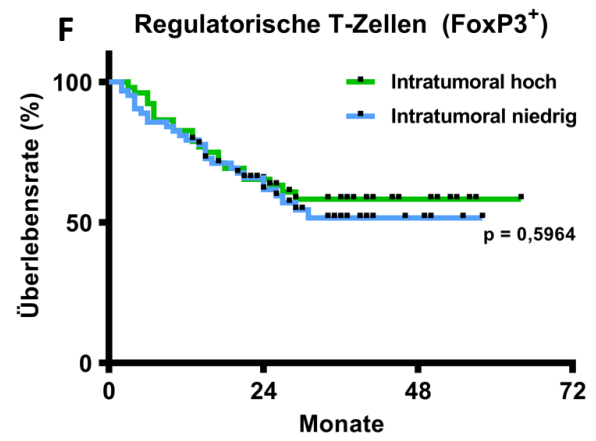
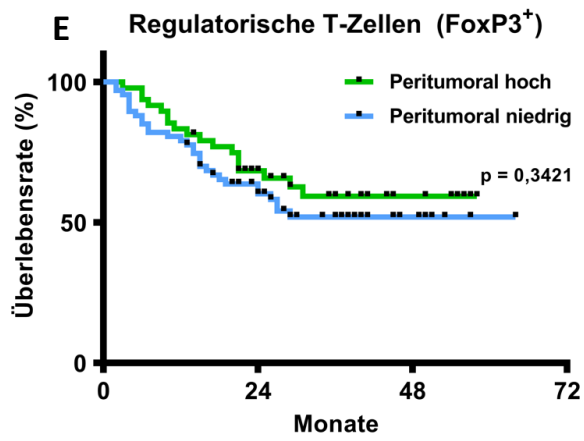
Durch das Ermitteln eines gerundeten Mittelwertes aller Immunreaktiven Scores (IRS) beziehungsweise der modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS) für die fünf untersuchten leukozytären Antigene (CD20, CTLA4, FasL, FoxP3, IL10) konnte das Patientenkollektiv jeweils in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe wies eine geringere Expression der tumorinfiltrierenden Leukozyten und deren Moleküle auf, hatte also einen IRS oder mIRS unterhalb des Mittelwertes, die andere Gruppe zeigte eine höhere Expression und somit einen IRS oder mIRS gleich oder größer des Mittelwerts. Der mIRS-Mittelwert für die leukozytäre intratumorale Expression von CD20 lag bei 2,0 und für FoxP3 bei 1,5. Peritumoral wiederum lag der Mittelwert für CD20 bei 5,5 und für FoxP3 bei 3,0. Der IRS-

4. Ergebnisse

Mittelwert für CTLA4 ergab intratumoral 1,5 und peritumoral 2,0. Bei FasL und IL10 lag der IRS-Mittelwert für die intratumorale membrangebundene Form bei 3,0 und 1,5 und für die intratumorale lösliche Form bei 3,5 beziehungsweise 2,5. Peritumoral befand er sich für die membrangebundene Form bei 6,5 und 2,0 und für die lösliche Form bei 3,5 und 1,5.

Wie in der Abbildung 27B dargestellt zeigte die Kaplan-Meyer-Überlebensanalyse eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit einer höheren intratumoralen Infiltration CD20 exprimierender Zellen verglichen mit Patienten mit einer geringeren Infiltration ($p=0,0401$). Auch die peritumorale Infiltration CD20 exprimierender Zellen (Abb. 27A) zeigte eine Tendenz zu einem verlängerten Überleben bei einer höheren Infiltration ($p=0,1394$). Wie in Abbildung 27C dargestellt, ging eine höhere peritumorale Infiltration CTLA4 exprimierender Leukozyten mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben des Patientenkollektivs einher ($p=0,0398$). Auch bei der intratumoralen Analyse (Abb. 27D) schien eine höhere Infiltration CTLA4 exprimierender Zellen mit einem Überlebensvorteil assoziiert zu sein ($p=0,0604$). FoxP3 (Abb. 27E) zeigte in der statistischen Auswertung geringe Tendenzen hin zu einem verlängerten Gesamtüberleben bei einer hohen peri- und intratumoralen Infiltration FoxP3 exprimierender Zellen ($p=0,3421$ und $p=0,5964$), ohne dass hier statistisch signifikante Effekte nachgewiesen werden konnten. Im in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil in Abhängigkeit von der Infiltration FasL und IL10 exprimierender Zellen.





4. Ergebnisse

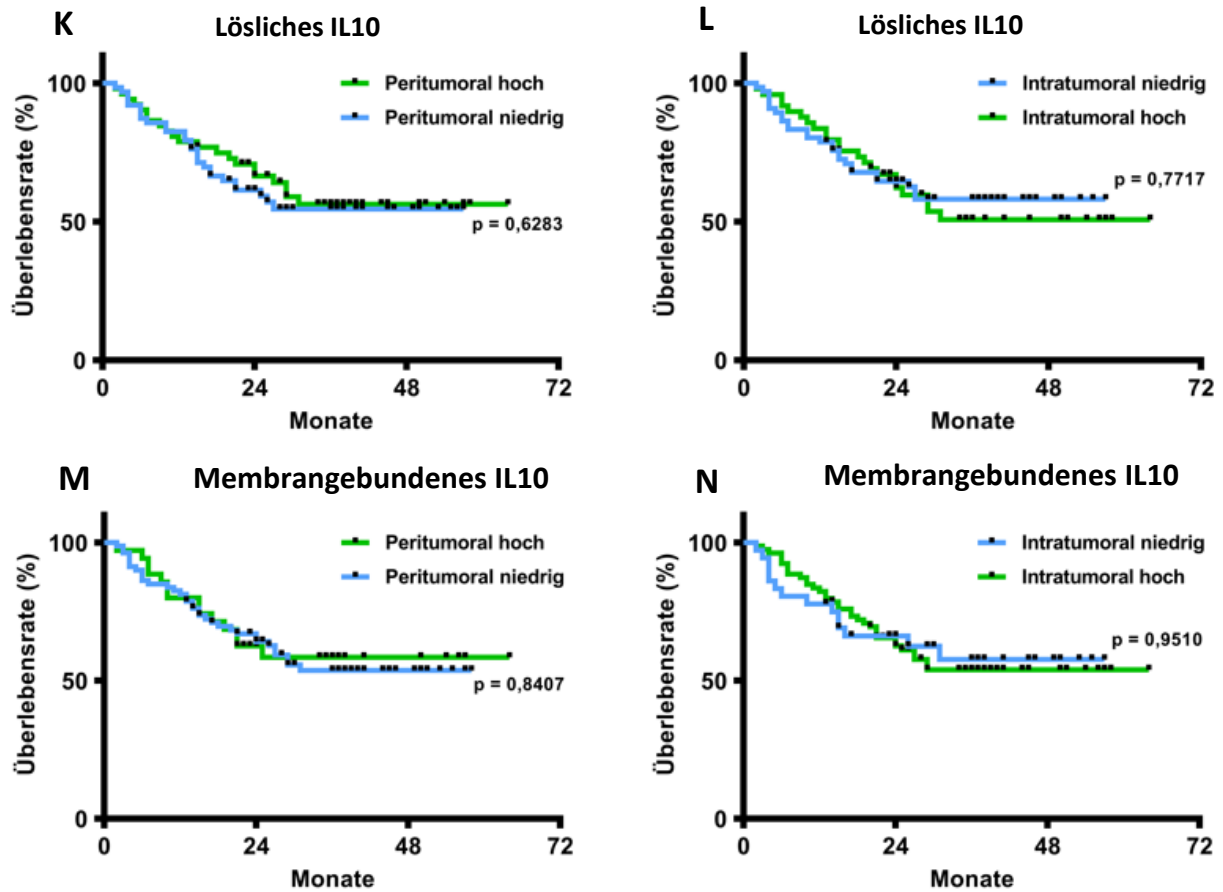


Abbildung 27: Einfluss des Ausmaßes der Infiltration der leukozytären Populationen bzw. der Expression der analysierten, regulatorischen Moleküle auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten. Dargestellt sind vierzehn Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Patientenkollektivs, in Abhängigkeit von der Höhe der peritumoralen Infiltration CD20, CTLA4, FoxP3, FasL und IL10 exprimierender Zellen (A, C, E, G, I, K, M) und des Ausmaßes der intratumoralen Infiltration (B, D, F, H, J, L, N). Schwarze Punkte symbolisieren zensierte Daten.

5. Diskussion

5.1 Stellenwert von Vitamin-D und der immunmodulatorischen Therapiekonzepte in der Kopf-Hals-Onkologie

Die Relevanz von bösartigen Tumorerkrankungen ist mit ihrem derzeitigen Status als zweithäufigste Todesursache in Deutschland deutlich ersichtlich. Die damit zusammenhängende Bedeutung für das Gesundheitssystem, die perspektivisch mit den steigenden Tumorinzidenzen durch demographischen Wandel, Globalisierung und wirtschaftlichen Wandel noch wachsen wird, ist nicht mehr abzustreiten (Robert Koch-Institut, 2016; World Health Organization, 2018). Dies legt nahe, dass es neuer Möglichkeiten bedarf, Tumoren früher und besser zu erkennen aber auch effektivere Therapiestrategien zu entwickeln. Als sechst häufigste Tumorentität mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich rund 55% scheinen neue Diagnostikkonzepte und Therapieziele gerade bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs von großer Bedeutung zu sein (Robert Koch-Institut, 2016).

Die schlechten Therapiemöglichkeiten dieser Tumorentitäten resultieren aus mehreren Faktoren. Einerseits liegt auf Grund der späten klinischen Symptomatik zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Lymphknotenmetastasen vor (Reiß, 2021), andererseits zeigen diese Tumore eine starke Suppression der antitumoralen Mechanismen des Immunsystems im Sinne eines „immune escape“ sowie die Entwicklung von Resistenzen gegen zielgerichtete Therapieansätze. Diese Eigenschaften befähigen sie dazu, dem Immunsystem, aber auch medikamentösen Therapien zu entkommen. Hinzu kommt der meist ohnehin schlechte Immunstatus der Patienten, sodass das durch ein hohes Patientenalter und chronischen Noxenabusus geschwächte Immunsystem kaum noch eine antitumorale Wirkung entwickeln kann (Bergmann et al., 2008; Mandal et al., 2016; Russell et al., 2011; Wild et al., 2010).

Behandlungsmöglichkeiten der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs umfassen die operative Entfernung im Gesunden, eine Bestrahlung und eine kombinierte Radiochemotherapie, entweder als alleinige Therapiestrategien oder in den meisten Fällen in Kombination. Hinzu kommen die bereits in der Einleitung ausführlich beschriebenen Antikörpertherapien mit dem Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab sowie den Anti-PD1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab aus der Gruppe der Checkpoint-Inhibitoren, die alleinig oder kombiniert einsetzbar sind (Ferris et al., 2016; Leemans et al., 2011; Schmoll, 2020). Limitierend an der Immuntherapie kann deren begrenzte Einsatzmöglichkeit nur in bestimmten Tumorstadien, die Abhängigkeit von der PD-1 Expression der Tumor und Immunzellen sowie deren Toxizität auf den restlichen Körper sein. Aus diesen Tatsachen geht hervor, dass neue Therapiemöglichkeiten erforderlich sind, die bestenfalls präventiv die

5. Diskussion

Entstehung der Tumoren vermeiden, die das Immunsystem während der Therapie unterstützen und die eigenständig antitumorale Wirkungen zeigen. Hierbei zeigten immuntherapeutische Ansätze in den letzten Jahren deutliche Fortschritte und haben das Therapiemanagement von HNSCCs bedeutend erweitert, sodass auch vor dem Hintergrund der immunmodulierenden Eigenschaften von Vitamin-D im Folgenden besonders auf die aktuelle Forschung zu immunmodulatorischen Therapiekonzepten eingegangen wird.

Es existieren zahlreiche, körpereigene Mechanismen, die durch das Verhindern von unkontrolliertem Zellwachstum die Krebsentstehung abwenden sollen. Hierzu trägt das Immunsystem einen großen Teil bei, indem es auf zellulärer und humoraler Ebene Schutzmechanismen koordiniert. Obwohl Tumorzellen aus körpereigenen Zellen entstehen und so zu großen Teilen vom Immunsystem nicht als pathologisch erkannt werden, besitzen sie auch tumorspezifische Antigene, gegen die keine immunologische Toleranz existiert. Zusätzlich kommt es im Rahmen der Expansion eines Tumors zu Entzündungsreaktionen, die zu einer antitumoralen Immunreaktion führen können (Rink et al., 2018). Die zelluläre Tumorabwehr des Immunsystems besteht im Wesentlichen aus den zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten, den T-Helferzellen und den B-Lymphozyten. Hinzu kommen NK-Zellen, die besonders auf die missing-self-Strategie von Tumoren reagieren. Dabei versuchen Tumoren über das Downregulieren von MHC-I-Molekülen nicht erkannt zu werden und sich so vor dem körpereigenen Immunsystem zu „maskieren“ (siehe Einleitung) (Rink et al., 2018). Die T-Killerzellen lösen in den von ihnen erkannten Tumorzellen die Apoptose aus, indem sie eine Granula aus Perforinen und Granzymen sezernieren. Genau wie die darin enthaltenen Proteasen, die Apoptosekaskaden auslösen, können CD8⁺-T-Zellen diese auch über die Interaktion ihres Oberflächenmoleküls FasL mit dem zugehörigen Todesrezeptor FasR auslösen. Die meisten Studien der letzten Jahre auf dem Gebiet der Kopf-Hals-Immunonkologie konzentrierten sich dabei auf die CD8⁺-T-Zellen, die sich als sehr potente Vermittler der Antitumorimmunität herausstellten (Benchetrit et al., 2003). Die Rolle der CD4⁺-T-Zellen ist hingegen umstrittener (Badoual et al., 2006; Pardoll & Topalian, 1998). Sie sezernieren als TH1-Zellen unter anderem IFN γ und IL2, als TH2-Zellen Interleukine wie IL10 und als proinflammatorische TH17-Zellen weitere Interleukine wie IL17. Diese Zytokine als Effektoren der T-Helferzellen aktivieren wiederum zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen oder B-Lymphozyten. T^{REG}-Zellen als weitere Untergruppe der TH-Zellen wirken eher immunsuppressiv und sezernieren beziehungsweise exprimieren IL10, TGF β , CTLA4 und FoxP3. B-Zellen wiederum können gegen Tumoren mit denen von ihnen synthetisierten Immunglobulinen vorgehen, die sich spezifisch gegen Antigene richten (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018). So wurden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs Antikörper gegen Antigene wie p40, p53, MUC1, HPV-E6 und HPV-E7 nachgewiesen (Zumbach et al., 2000). NK-Zellen produzieren ebenfalls Interferone wie IFN γ , sie

sezernieren Apoptose initiierende, zytotoxische Granula und sie exprimieren ähnlich wie T-Killerzellen FasL (Rink et al., 2018).

Indem Tumoren die Immunzellen ihrer Umgebung beeinflussen, umprogrammieren und auch ihre eigenen Zellen modulieren, gelingt es ihnen einer suffizienten Immunantwort zu entgehen. In einigen Studien konnten diese tumoralen Mechanismen gegen die antitumorale Immunantwort näher charakterisiert werden (Ferris, 2015; Walker et al., 2012). Besonders die zu den CD4⁺-T-Zellen zählenden T^{REG}-Zellen können je nach Tumorstadium die immunvermittelte Tumorabwehr und das Ansprechen auf eine Immuntherapie behindern (Shimizu et al., 1999). Hierfür können sie zur Sekretion von Zytokinen stimuliert werden, die das Tumorwachstum fördern (Chikamatsu et al., 2007). Gegenstand neuester Forschungen ist es, diese Umprogrammierung der Immunzellen durch Tumoren zu verhindern, sodass tumorprogressionsfördernde Zellen zu ihrer ursprünglichen antitumoralen Funktion zurückkehren (Kansy et al., 2015).

Bisherige immuntherapeutische Ansätze auf dem Gebiet der Kopf-Hals-Tumoren umfassen einerseits die HPV-Impfungen, andererseits Zytokintherapien, Toll-like-Rezeptor-Stimulation, Immuncheckpoint-Inhibitoren und eine targeted therapy mittels monoklonaler Antikörper (R. B. Cohen, 2014; Ferris et al., 2016; Kansy et al., 2015; Okamoto et al., 2006; Ramqvist & Dalianis, 2010). Die Komplexität der Entstehung eines Tumors und die des Immunsystems erschwert zum einen eine Therapiefindung und begünstigt die Entwicklung von Resistenzmechanismen, bietet allerdings auch die Möglichkeiten vieler verschiedener Therapieansätze, die unter Umständen auch eine synergistische Wirkung zeigen können, wenn sie in Kombination eingesetzt werden. Gerade Kopf-Hals-Tumoren, die das Tumormilieu auf unterschiedlichen Ebenen modulieren, stellen eine große Herausforderung dar. Vakzinierungen sind besonders gegen die HPV-Risikosubtypen HPV16 und HPV18 relevant und spielen hinsichtlich des steigenden Anteils HPV-assoziiierter Kopf-Hals-Tumore eine größer werdende Rolle (Ramqvist & Dalianis, 2010). Zytokintherapien mit monoklonalen Antikörpern gegen inhibierende Zytokine wie VEGF sind bereits beim Kolorektal-, Lungen, Nierenzell- und Zervixkarzinom zugelassen. Aber auch immunstimulierende Zytokine wie IL-2 können in der Immuntherapie ihren Einsatz finden, wie beispielsweise bereits in der Therapie des malignen Melanoms gezeigt (Atkins et al., 2000). Als Hauptgruppe der Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) können Toll-like Rezeptoren (TLR) mit Pathogenen assoziierte Moleküle erkennen und eine Abwehrreaktion des Körpers initiieren. So wurde die Zulassung des TLR4-Agonist Picibanil (OK-432) in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren angestrebt, war letztendlich aber durch die nicht ausreichend nachgewiesene Effektivität in klinischen Studien nicht erfolgreich (Okamoto et al., 2006). Immuncheckpointrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von T-Effektorzellen, indem diese bei Aktivierung immunstimulierende Signale fördern und immunsupprimierende

Signale unterdrücken. Diese Immuncheckpointrezeptoren stehen derzeit im Fokus der immuntherapeutischen Strategien in der Kopf-Hals-Onkologie. Die Förderung stimulierender Signale erfolgt hierbei über Agonisten kostimulierender Rezeptoren der T-Zellen, wie zum Beispiel durch den monoklonalen Antikörper-Agonist von OX40 (CD134), der die T-Zell-Aktivierung aufrecht erhält (Curti et al., 2013). Ipilimumab, der monoklonale Antikörper gegen CTLA4, verhindert inhibierende Signale indem CTLA4 nicht mehr an CD80 und CD86 binden kann und es so nicht mehr zur Inaktivierung des T-Zell-Rezeptors kommt (Lee et al., 1998). In der Therapie des malignen Melanoms erzielt Ipilimumab seit 2011 bereits große Erfolge und führt zu deutlich längeren Überlebensraten. Sein Einsatz im Rahmen von Kopf-Hals-Tumoren und auch Prostata Tumoren wird derzeit noch erforscht, insgesamt scheint jedoch Ipilimumab bei Kopf-Hals-Tumoren basierend auf den bisherigen Studiendaten keine wesentlichen therapeutischen Effekte erreichen zu können (Hodi et al., 2010). Nivolumab, als Anti-PD1-Antikörper, ist seit Mai 2017 in der Therapie von Platin-refraktären Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs in der Zweitlinientherapie zugelassen, während der ebenfalls gegen PD1-gerichtete Antikörper Pembrolizumab seit Oktober 2018 für die gleiche Indikation auf dem Markt ist (R. B. Cohen, 2014; Ferris et al., 2016). Die Zulassung von Pembrolizumab wurde basierend auf den Ergebnissen der KEYNOZE-048-Studie zudem erweitert auf die Erstlinientherapie von RM-HNSCC-Patienten, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie. Auch Cetuximab wird seit vielen Jahren in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eingesetzt, da diese nahezu immer eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) zeigen. Hier kann Cetuximab im Rahmen des EXTREME- oder TP-EXTREME-Protokolls in der palliativen Systemtherapie eingesetzt werden oder in Kombination mit einer Strahlentherapie für die systemische Behandlung von LA-HNSCC-Patienten genutzt werden, wobei der therapeutische Effekt anders als bei den Checkpoint-Inhibitoren überwiegend durch die Inhibition des EGFR-Signalwegs und weniger über immunologische Effekte wie eine ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) vermittelt wird (R. B. Cohen, 2014).

Diese Therapieansätze verdeutlichen das Potenzial der Immuntherapie in der Krebsbekämpfung, unterstreichen aber auch deren Grenzen. Je nach Expression der Zielantigene sind immuntherapeutische Ansätze nur eingeschränkt möglich und werden zusätzlich durch unerwünschte Nebenwirkungen limitiert. Hierbei sind u.a. die Autoimmunhepatitis, -pneumonitis, -colitis und -hypophysitis zu nennen, die häufig in einem Abbruch der Therapie resultieren (Guidi et al., 2020). Hinzu kommt, dass der Einsatz meist nur in fortgeschrittenen Stadien aufgrund der (noch) beschränkten Zulassungen möglich ist. Ein Immunmodulator allein erreicht dabei in <25% der Fälle ein relevantes Therapieansprechen mit nochmal deutlich geringeren Raten für eine komplette Tumorremission, was die hohen Therapiekosten von mehr als 100.000€ pro Patient und Jahr

zumindest in Frage stellt und die Notwendigkeit von prädiktiven Biomarkern unterstreicht (Mehra et al., 2020; Yokota et al., 2020, 2021).

An diese Probleme schließt sich der meist erst späte Zeitpunkt des Therapiebeginns an. Die in der Mehrzahl der Fälle erst späte klinische Manifestation der Kopf-Hals-Tumoren impliziert auch eine erst späte weiterführende Diagnostik und im letzten Schritt eine spät einsetzende Therapie. Der beste Zeitpunkt für eine Immuntherapie stellt sich aber zu einem viel früheren Zeitpunkt dar. Das bereits angesprochene Immun-Editing, das die Interaktion zwischen dem Immunsystem und den Tumoren beschreibt, wird in drei Phasen unterteilt. Als Eliminierungsphase wird die erste Phase bezeichnet und beschreibt das Erkennen der Tumorzellen von Immunzellen, die diese anschließend eliminieren. Daran knüpft als zweite Phase die Gleichgewichtsphase an, in der die vollständige Eliminierung der transformierten Zellen nicht mehr gelingt, jedoch die antitumorale Immunabwehr insofern suffizient ist, dass keine Proliferation der Tumorzellen und damit kein klinisches Tumorwachstum auftritt. In der letzten Phase kommt es zum „Immunescape“, sodass der Tumor durch Selektionsprozesse dem Immunsystem entkommt, zu wachsen beginnt und dann klinisch apparent wird (Rink et al., 2018). Die Möglichkeit einer Diagnose im Stadium der tumoralen Vorläuferzellen wäre für die immuntherapeutische Primärprävention essenziell, ist allerdings zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung noch nicht möglich. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass das Immunsystem von vornherein im Sinne einer Primärprävention der Entstehung von Tumorerkrankungen gefördert und gestärkt werden sollte und auch bereits erkrankte Patienten in dieser Hinsicht unterstützt werden sollten, damit bei schon vorliegender Tumorerkrankung die antitumorale Aktivität des Immunsystems stimuliert werden kann. Dies ist besonders im Rahmen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs von großer Bedeutung, da diese wie bereits geschildert unabhängig vom bereits geschwächten Immunsystem der Patienten stark immunsuppressiv wirken (Russell et al., 2011). Vor diesem Hintergrund bietet sich eine Vitamin-D-Supplementierung daher sowohl im Sinne einer Primärprävention bei Nicht-Tumorpatienten wie auch in der supportiven Therapie von Patienten mit Tumorerkrankungen an.

Für Vitamin-D konnte neben seiner physiologischen Funktion im Calcium- und Phosphatstoffwechsel eine immunregulatorische und antitumorale Wirkung in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien nachgewiesen werden (Anderson et al., 2010; Baeke et al., 2010; Guyton et al., 2001; Mora et al., 2008; Prietl et al., 2013; Tretli et al., 2012). Nachgewiesenermaßen verlängert die Vitamin-D-Substitution das Gesamtüberleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Anand et al., 2013; Bochen et al., 2018; Fathi et al., 2019; Gugatschka et al., 2011). Indem sich der Vitamin-D-Rezeptor auf Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen finden lässt, beeinflusst es unter anderem deren Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Funktion (Baeke et al., 2010;

Mora et al., 2008; Rink et al., 2018). Mit diesen vielfältigen Funktionen auf das Immunsystem könnte Vitamin-D eine erfolgreiche Unterstützung gegen die Immunescape-Mechanismen von Kopf-Hals-Tumoren darstellen. Dabei scheint die Höhe des Vitamin-D-Spiegels von entscheidender Bedeutung zu sein, da beispielsweise ab einem Spiegel von unter 30 ng/ml ein doppelt so hohes Erkrankungsrisiko für kolorektale Karzinome nachgewiesen werden konnte. Bei an Brustkrebs erkrankten Frauen afroamerikanischen Ursprungs, mit dementsprechend pigmentierter Haut, trat eine um 29% höhere Mortalitätsrate auf (Anderson et al., 2010; Garland et al., 2006; Tretli et al., 2012). Auch im Hinblick auf Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs korreliert ein niedriger Vitamin-D-Serumspiegel mit einer schlechteren Prognose und einem höheren Erkrankungsrisiko (Fathi et al., 2019; Gugatschka et al., 2011). Auffällig hierbei ist, dass gerade Tumorpatienten des Kopf-Hals-Bereichs häufig einen Vitamin-D-Mangel aufweisen (Bochen et al., 2018; Orell-Kotikangas et al., 2012). Die Studie der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes von Bochen et al. zeigte, dass Patienten mit einem ausreichend hohen Vitamin-D-Serumspiegel signifikant weniger Lymphknotenmetastasen aufwiesen und auch durch ein längeres Gesamtüberleben gekennzeichnet waren (Bochen et al., 2018). Der Effekt einer ausreichend hohen Vitamin-D-Versorgung zeigt sich außerdem in einer höheren Infiltration des Tumorgewebes und des peritumoralen Stromas von HNSCCs mit T-Helferzellen, T-Killerzellen, NK-Zellen und Makrophagen (Bochen et al., 2018). Darüber hinaus scheint Vitamin-D die Sekretion tolerogener und entzündungshemmender Zytokine wie IL-10 zu steigern, zu einer Verschiebung der Differenzierung von T-Zellen hin zu T^{REG} zu führen und direkt die Erregerabwehr von Viren und Bakterien zu fördern (Baeke et al., 2010; Gombart et al., 2005; Lemire et al., 1984; Mora et al., 2008; Rink et al., 2018; T.-T. Wang et al., 2004). Hinzu kommen nachgewiesene antitumorale Effekte des Vitamin-D, wie die Induktion der Apoptose und Hemmung der Tumorzell-Proliferation, Unterstützung der Antiinflammation, Stimulation der Tumorzell-Differenzierung, Inhibition der Angiogenese und Metastasierung (Ben-Shoshan et al., 2007; Blutt et al., 2000; Chung et al., 2009; Fathi et al., 2019; Fukuda et al., 2003; Gocek & Studzinski, 2009; Moreno et al., 2005; Welsh, 2012). In einer Studie von Berger et al. konnte der positive Effekt einer unterstützenden Einnahme von Vitamin-D parallel zur Therapie mit Cetuximab bei einem metastasierten Kolonkarzinom bereits nachgewiesen werden (Berger et al., 2018).

Ebenso existieren bereits erste klinische Studien, die einen synergistischen, antitumoralen Effekt einer Checkpoint-Inhibitor-Therapie in Kombination mit einer Vitamin-D-Supplementation bei verschiedenen Tumorentitäten zeigen konnten. So konnte bei der näheren Untersuchung der Effekte von Vitamin-D in malignen Melanomen festgestellt werden, dass Vitamin-D in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren eine synergistische Wirkung besitzt (Stucci et al., 2018). Ein Team um Bersanelli et al. untersuchte in einer

prospektiven Beobachtungsstudie (164 Patienten) den positiven Einfluss von Vitamin-D auf Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomdiagnosen, die mit Immuncheckpoint-Inhibitoren therapiert wurden. Es wurde ein verlängertes Gesamtüberleben, ein gesteigertes Intervall bis zum Therapieversagen, eine reduzierte Zahl an Behandlungsabbrüchen und eine reduzierte Letalität festgestellt. Zudem konnten die unerwünschten Nebenwirkungen der Immuncheckpoint-Inhibitoren reduziert werden (Bersanelli et al., 2023). Unterstützt werden diese Erkenntnisse durch die Daten einer umfangreichen Metaanalyse, veröffentlicht im *British Journal of Cancer* (n=44.165, Patienten aus 64 Studien), die ebenfalls zeigten, dass ein hoher Vitamin-D-Spiegel bei Tumoren unterschiedlichster Lokalisationen in einem insgesamt verbesserten Gesamtüberleben resultiert (Hazard Ratio: 0,74) (Vaughan-Shaw et al., 2017). In der Folge wird beispielsweise am Universitätsklinikum des Saarlandes der 25-OH-Vitamin-D-Spiegel von allen HNSCC-Patienten bereits in der klinischen Routine bestimmt und im Falle eines Mangels wird Vitamin-D substituiert.

Zusammenfassend wird der positive Effekt von Vitamin-D auf das Immunsystem im Allgemeinen und die antitumorale Aktivität des Immunsystems bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs im Speziellen deutlich. Zusätzlich führt es zu besseren Prognoseaussichten und einem längeren Gesamtüberleben. Vor dem Hintergrund, dass Vitamin-D ein zum Teil vom Körper selbst synthetisiertes Hormon darstellt und in Medikamentenform nebenwirkungsarm und vergleichsweise günstig ist bietet sich ein Einsatz in der klinischen Versorgung von HNSCC-Patienten an, da es das Immunsystem der Patienten effektiv unterstützen und zudem direkte antitumorale Effekte auf HNSCC zeigen kann. Bisher wird Vitamin-D in der klinischen Praxis der multimodalen Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren leider kaum beachtet, sodass ein Vitamin-D-Mangel bei den betroffenen Patienten weiterhin sehr häufig ist und auch nicht adäquat behandelt wird.

Diesen Annahmen sind einige wenige Studien gegenüberzustellen, die dem Vitamin-D-Status bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs keine wesentliche Relevanz im Hinblick auf das Erkrankungsrisiko und das Gesamtüberleben zusprechen. Eine Studie von Meyer et al. erforschte das Auftreten von Rezidiven und Zweittumoren im Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Serumspiegel an 540 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen (Meyer et al., 2011). Sie kam zum Ergebnis, dass Vitamin-D keinen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten hat. Unterstützt wird diese Annahme von einer finnischen Studie von Arem et al., die die Inzidenzen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs in keinen Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Serumspiegel der beobachteten Probanden bringen konnten (Arem et al., 2011). Auf der anderen Seite stehen diesen Studien zahlreiche andere Forschungsergebnisse gegenüber, die einem ausreichenden Vitamin-D-Status einen positiven Effekt auf die Prognose von malignen Tumorerkrankungen im Allgemeinen (Gugatschka et al., 2011; Vaughan-Shaw et al., 2017) und eine

Verbesserung der antitumoralen Immunreaktion zusprechen (Baeke et al., 2010; Guyton et al., 2001; Mora et al., 2008; Prietl et al., 2013; Tretli et al., 2012). Zahlreiche Fehlerquellen können ursächlich für die Diskrepanz dieser Ergebnisse sein. So sind insbesondere individuelle Risikofaktoren wie der Alkohol- und Nikotinkonsum nur schwer zu kontrollieren. Auch weisen die in die Studien eingeschlossenen Patienten unterschiedliche tägliche Sonnenlicht-Expositionen, Lebensgewohnheiten in der Nahrungsaufnahme, Vordiagnosen wie auch HPV-Status und Medikamenteneinnahmen auf. Diese Störfaktoren, sowie unterschiedliche Definitionen des Vitamin-D-Mangels machen eine vergleichbare Datenanalyse schwierig. Darüber hinaus konzentrieren sich die obig genannten Studien allesamt auf retrospektive Daten, weisen keine großen Fallzahlen auf und umfassen keine molekularbiologischen Untersuchungen, was den Einfluss von Vitamin-D auf die untersuchten Faktoren nur eingeschränkt beurteilbar macht.

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

Wie bereits zuvor dargestellt spielt Vitamin-D eine große Rolle für die Funktionalität und Aktivität des menschlichen Immunsystems und beeinflusst dieses in seiner zellulären Immunreaktion und Tumorabwehr. Auch HNSCC-Patienten wiesen vor diesem Hintergrund bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel eine deutlich verstärkte peri- und intratumorale Infiltration von Immunzellen in einer von unserer Arbeitsgruppe publizierten Studie auf (Bochen et al., 2018). Der Einfluss von Vitamin-D auf die Zusammensetzung regulatorischer Populationen tumorinfiltrierender Leukozyten und auch deren Moleküle wurde allerdings bisher kaum näher untersucht. Gerade für die Einbindung von Vitamin-D in die immunmodulatorischen, antitumoralen Therapieansätze wäre diese Fragestellung äußerst interessant, um zusätzlich zu untersuchen, inwiefern auch die Aktivität der tumorinfiltrierenden Immunzellen durch Vitamin-D beeinflusst wird. Es stellt sich parallel die Frage, wie sich der Vitamin-D-Status auf die unterschiedlichen Moleküle auswirkt und ob dies letztendlich die antitumorale Effektivität des Immunsystems der Patienten stärkt. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemische Färbungen an Tumorgewebeproben von 116 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs angefertigt. Diese Färbungen wurden mithilfe von fünf Antikörpern gegen die Moleküle CD20, CTLA4, FasL, FoxP3 und IL10 durchgeführt. Unterschieden wurde dabei deren Färbemuster in intra- und peritumoral infiltrierten Leukozyten. Zusätzlich wurde bei IL10 und FasL die membrangebundene von der einer löslichen Form in den IHC-Färbungen sowohl für die intra- als auch peritumoralen Immunzellen unterschieden. Die fünf Antikörper wurden dabei ausgewählt, um B-Zellen, T^{REG}-Zellen, CD8⁺-T-Killerzellen, NK-Zellen und TH2-Zellen sowie deren Aktivitätsstatus analysieren zu können. Das Kollektiv gliederte sich

in 63 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und 53 Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel. Insgesamt wurden so über 1000 immunhistochemische Präparate angefertigt, die neben den am Ende ausgewerteten Präparaten auch die Etablierungsversuche sowie Positiv- und Negativkontrollen umfassten. Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe des Immunreaktiven Scores, der für zwei Antikörper erweitert und für weitere zwei der fünf Antikörper angepasst wurde.

Die untersuchten Moleküle repräsentieren jeweils unterschiedliche Populationen der zellulären Immunabwehr. So steht CD20, als spezifisches Oberflächenmolekül der B-Lymphozyten, für deren Vertretung im tumorumgebenden Milieu (Rink et al., 2018). CTLA4 wiederum befindet sich auf CD4⁺-T-Helferzellen wie unter anderem den T^{REG} Zellen, aber auch auf CD8⁺-T-Killerzellen und beendet mit seiner immunsuppressiven Wirkung fehlgeleitete und erfolgreich abgeschlossene Immunantworten (Heinrich et al., 2014; Rink et al., 2018). Repräsentativ für T-Killerzellen und NK-Zellen steht der Ligand des Todesrezeptoren FasL, der autoreaktive und neoplastische Zellen in die Apoptose leitet und Teil der zytotoxischen Granula der NK-Zellen ist (Malarkannan, 2020; Rink et al., 2018). FoxP3 steht als Transkriptionsfaktor der CD4⁺-T^{REG}-Zellen für die Immunsuppression durch Unterdrückung der TH1- und TH2-Immunantwort (Heinrich et al., 2014; Lafaille & Lafaille, 2009; Rink et al., 2018). Als letztes der fünf Moleküle wird IL10 neben Monozyten und dendritischen Zellen vor allem von TH2 und T^{REG} Zellen sezerniert und lenkt die T-Zell-Antwort von den TH1-Zellen zu den TH2-Zellen (Hof et al., 2017; Rink et al., 2018).

Der Einfluss dieser Moleküle bzw. der Expression dieser Moleküle auf tumorinfiltrierende Leukozyten auf die Prognose von Tumorerkrankungen und insbesondere auf Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs wurde bereits in einigen Studien untersucht, wenn auch meist nur einzeln und nicht wie in der vorliegenden Arbeit in dieser Kombination an einem einheitlichen Patientenkollektiv. Im Folgenden sollen diese Studien auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit näher diskutiert werden. Inwiefern sich auch der Vitamin-D-Status auf die Infiltration der betrachteten Leukozyten mit ihren zugehörigen Effektormolekülen im Rahmen von Kopf-Hals-Tumoren auswirkt, wurde bisher noch nie betrachtet, was ebenfalls Motivation zur Durchführung der vorgelegten Arbeit war.

Die immunhistochemischen Analysen zeigten in unserer Arbeit eine positive Korrelation zwischen einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und der gesteigerten Infiltration des Tumors mit CD20⁺-B-Zellen. So war die intratumorale Infiltration bei Patienten mit einem ausreichend hohen Vitamin-D-Spiegel statistisch signifikant gesteigert ($p=0,0289$), während im peritumoralem Gewebe lediglich eine deutliche Tendenz hin zu einer vermehrten Infiltration nachweisbar war ($p=0,0662$). Auch das Gesamtüberleben war im Zusammenhang mit einer höheren intratumoralen Infiltration mit CD20⁺-B-Zellen statistisch signifikant verlängert ($p=0,0401$). Die höhere peritumorale Infiltration CD20⁺-B-Zellen zeigte ebenfalls

5. Diskussion

eine Tendenz hin zu einem verlängerten Überleben ($p=0,1394$). Als Oberflächenmolekül der B-Zellen kann CD20 ab dem späten Pro-B-Stadium nachgewiesen werden. Während die positive antitumorale prognostische Bedeutung von T-Zellen weitestgehend auch über verschiedene Tumorentitäten anerkannt ist, ist die Datenlage bei den Auswirkungen der B-Zellen deutlich kontroverser (Fridman et al., 2017). Die Aktivierung der B-Zellen bei Autoimmunität und Transplantatabstoßungen ist mit einer der aggressivsten Immunreaktionen gegen Gewebe verbunden (Yanaba et al., 2008). Aus diesem Grund wird die Depletion von B-Zellen zu einem therapeutischen Ansatz für Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes, Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis eingesetzt (Kamal & Khamashta, 2014; McInnes & Schett, 2017; Milo, 2016). Für die Entwicklung wirksamer antitumoraler Immuntherapien ist es von entscheidender Bedeutung, die Rolle von B-Zellen in der antitumoralen Immunität zu verstehen. Eine Metaanalyse mit systematischer Durchsicht von 69 Publikationen bis zum 01.12.2017 beschäftigte sich mit der prognostischen Bedeutung tumorinfiltrierender B-Zellen bei menschlichen Tumorerkrankungen. Es zeigte sich passend zu den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit, eine mehrheitlich positive Rolle der B-Zellen in der Antitumorimmunität (Wouters & Nelson, 2018). Hierbei wurden verschiedene Krebsentitäten in die Studie eingeschlossen ausgenommen Lymphome, Leukämien, Myelome und lymphoproliferative Erkrankungen, da hier die B-Zellen selbst die Funktion von Tumorzellen übernehmen können. Studien mussten mindestens eine Stichprobengröße von $n=50$ aufweisen, der Nachweis der B-Zellen musste über die Immunhistochemie oder über Genexpressionssignaturen erfolgen und der Einfluss auf das Patienten-Outcome musste anhand des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens oder des progressionsfreien Überlebens gemessen worden sein (Wouters & Nelson, 2018). B-Zellen scheinen dabei vor allem über die Sezernierung immunstimulierender Zytokine wie IL2, IL4, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ und indirekt über die Antigenpräsentation die genannten positiven Effekte auf die antitumorale Wirkung des Immunsystems zu vermitteln (Lund & Randall, 2010; Rodríguez-Pinto, 2005). In denjenigen Studien, in denen die B-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren, könnte die B-Zell-Antwort in Richtung eines regulatorischen (B^{REG}) Phänotyps modifiziert sein. So kommen B^{REG} nachgewiesenermaßen in verschiedenen krankheitsspezifischen Kontexten vor und können $CD8^+$ -T-Zellen durch die Produktion von suppressiven Zytokinen wie IL10 und $TGF\beta$ und die Rekrutierung von T^{REG} in die Mikroumgebung des Tumors hemmen (Balkwill et al., 2013). Eine andere Studie ergab, dass besonders Niedrigrisikopatienten mit einem Kopf-Hals-Tumor unter einer hohen CD20-Infiltration ein verbessertes Gesamtüberleben aufzeigten (Distel et al., 2009). Eine Studie von Cabrita et al. wies nach, dass das gemeinsame Auftreten von tumorassoziierten $CD8^+$ -T-Zellen und $CD20^+$ -B-Zellen unabhängig von anderen klinischen Variablen mit einem verbesserten Überleben bei

Melanompatienten verbunden ist (Cabrita et al., 2020). Dabei wurden klinische Proben von metastasierten Melanomen verwendet, immunhistochemisch gefärbt und retrospektiv das Gesamtüberleben ausgewertet (Cabrita et al., 2020). Trotz dieser Ergebnisse sind die genauen Funktionen von B-Zellen im Kontext der Antitumor-Immunität auch in der Kopf-Hals-Onkologie nach wie vor unzureichend verstanden. Sie scheinen besonders auch in Zusammenarbeit mit T-Zellen die antitumorale Abwehr und die Prognose der Tumorpatienten zu verbessern. Perspektivisch wäre es interessant den Einfluss der B^{REG}-Population näher zu untersuchen und auch Plasmazellen anhand spezifischer Marker im Tumormilieu zu identifizieren. Potenziell relevante Immuntherapiestrategien könnten sich den Einsatz von B-Zell-stimulierenden Zytokinen wie IL21 (Croce et al., 2015), sowie B-Zell-Agonisten wie den CD40-Liganden (Vonderheide, 2018), oder die Blockade von hemmenden Signalen durch PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1) zu Nutze machen (Good-Jacobson et al., 2010).

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen von CTLA4 zeigte nur wenig signifikante Ergebnisse. Weder die CTLA4-Expression der infiltrierenden Leukozyten intratumoral ($p=0,5573$) noch peritumoral ($p=0,9621$) zeigten eine statistisch signifikante Erhöhung oder Erniedrigung bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Eine höhere peritumorale Infiltration der CTLA4 exprimierenden Leukozyten ging allerdings mit einem statistisch signifikanten verlängerten Gesamtüberleben einher ($p=0,0398$). Auch intratumoral scheint eine höhere Infiltration mit einem Überlebensvorteil assoziiert zu sein ($p=0,0604$). Als Oberflächenmolekül von CD4⁺-T^{REG}-Zellen und CD8⁺-T-Killerzellen terminiert CTLA4 die T-Zell-Aktivierung, fördert die Bildung immunsuppressiver Zytokine und Rezeptoren und beendet so Immunantworten (Heinrich et al., 2014; Rink et al., 2018). Um einer antitumoralen Immunantwort zu entkommen, induzieren folglich viele Tumore eine gesteigerte leukozytäre CTLA4-Expression, um so gegen sie gerichtete Immunreaktionen zu beenden. Diese Tatsache könnte als Erklärungsansatz dienen, warum in VDA-Patienten mit einem dadurch gestärkten Immunsystem, die CTLA4 Expression nicht signifikant erhöht ist, da sonst die Tumorprogression gefördert werden könnte. In einer kürzlich publizierten Studie wurde ebenfalls die Frage untersucht, inwiefern die leukozytäre Expression von CTLA4 von der Präsenz eines Tumors abhängt und sich auf die Prognose von Tumorpatienten auswirkt. Hierfür wurden 33 verschiedenen Krebsarten von 122 Patienten untersucht und ihre prognostische Bedeutung analysiert (Liu et al., 2020). Die Ergebnisse zeigten zum einen eine hochregulierte Expression von CTLA4 auf den Leukozyten von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und zum anderen, dass eine gesteigerte CTLA4-Expression mit einem geringeren Gesamtüberleben unter der Therapie mit Zytokin-induzierten-Killerzellen einher geht (Liu et al., 2020). Um den kennzeichnenden inhibierenden Effekt von CTLA4 zu blockieren, existieren bereits im klinischen Einsatz

befindliche, therapeutische Antikörper. Ipilimumab, als monoklonaler Anti-CTLA4-Antikörper ist bei der Therapie des malignen Melanoms bereits seit vielen Jahren in therapeutischem Einsatz (Rink et al., 2018). Die Therapie mit CTLA4-Blockern, besonders auch in der Kombination mit PD1-Blockern, verbessert nachgewiesenermaßen die Prognose von Tumorpatienten (Darvin et al., 2018; Rotte, 2019). Interessanterweise konnten Studien, die den Einfluss von Vitamin-D auf die CTLA4-Expression bei nicht-neoplastischen, entzündlichen Erkrankungen, wie der chronischen entzündlichen Darmerkrankung Colitis Ulcerosa untersuchten, einer gesteigerten CTLA4-Expression einen positiven Effekt zuschreiben. Hier steigerte Vitamin-D die Expression von CTLA4, sodass überschießende Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen verhindert wurden (Jeffery et al., 2009, 2015; Sharifi et al., 2019). Die im Vergleich zur insgesamt spärlich existierenden Literatur eher widersprüchlichen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, die eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei hoher CTLA4-Expression zeigten, können unterschiedliche Gründe haben. Unter anderem ist die begrenzte Anzahl an Patienten zu nennen sowie, die hieraus resultierende, fehlende Möglichkeit zur Durchführung einer Multivarianzanalyse. Zum anderen erschweren die heterogenen Patientenkollektive in den vorliegenden Studien eine gute Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit mit bereits existierenden Patientendaten aus anderen Studien. Da wie bereits geschildert im Rahmen klinischer Studien eine Anti-CTLA4-Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren nicht erfolgreich war und keinen klinischen Nutzen für die behandelten Patienten erbrachte, scheint CTLA4 jedoch insgesamt im Kontext der antitumoralen Aktivität des Immunsystems bei HNSCC-Patienten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die statistische Auswertung des Färbeverhaltens von FasL zeigte ebenfalls nur wenig signifikante Ergebnisse. Anhand der p-Werte der Färbeergebnisse intra- und peritumoral in löslicher und lokalisierter Form ließ sich kein signifikantes Ergebnis formulieren. Auch zeigte sich im untersuchten Kollektiv kein statistisch signifikanter Effekt auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der FasL-Expression. FasL, als Ligand des Todesrezeptors Fas, findet sich auf CD8⁺-T-Killerzellen und auch NK-Zellen. Neben der membrangebundenen Form (mFasL), von der im Allgemeinen gesprochen wird und welche für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist, ist die lösliche Form (sFasL) durch nicht-apoptotische Aktivitäten eher an der Tumorentstehung beteiligt (Heinrich et al., 2014; O' Reilly et al., 2009; Schneider et al., 1998). Indem es in seinen Zielzellen die Apoptose auslöst, ist mFasL in großem Ausmaß an der Eliminierung neoplastischer Zellen beteiligt. So liegt es nahe, dass Tumoren versuchen, mFasL herunterzuregulieren, um ihrem Zelltod zu entkommen, während sFasL vermehrt exprimiert werden sollte. Laut den Ergebnissen unserer Untersuchungen scheint Vitamin-D auf diesen Prozess zumindest in den von uns untersuchten HNSCC-Patienten keinen signifikanten Einfluss zu haben. Die Ergebnisse der Studie einer anderen Arbeitsgruppe

ergaben eine Vitamin-D-induzierte Down-Regulation von FasL, um apoptotische Vorgänge im Rahmen einer Erkrankung an systemischem Lupus erythematoses zu reduzieren (Tabasi et al., 2015). Eine Studie, die die Prognose von Zervixkarzinomen in Abhängigkeit von unter anderem der FasL-Expression untersuchte kam zum Ergebnis, dass das Gesamtüberleben der Patientinnen bei einer geringen FasL-Expression im Vergleich zur hohen Expression verkürzt war (Liang et al., 2015). Zusätzlich schien die Expression mit der Tumorgröße, der Lymphknotenmetastasierung und dem TNM-Stadium zu korrelieren (Liang et al., 2015). In einer weiteren Studie wurde ein auf orale Plattenepithelkarzinome gerichteter Antikörper, der mit FasL fusioniert war und als Agonist von FasL agieren sollte, getestet. Dieser stellte sich als wirksames Apoptose-induzierendes Medikament heraus, was in der Hemmung der Proliferation der Tumorzellen resultierte. Sicher ist, dass die durch FasL repräsentierten NK-Zellen maßgebend an der Tumorabwehr beteiligt sind (Nowak et al., 2023). In einer weiteren Studie zeigte sich, dass Patienten die an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankt waren, das eine niedrige FasL-Expression aufwies mit einer schlechteren Prognose gekennzeichnet waren, mehr Lymphknotenmetastasen auftraten sowie eine höhere Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen vorlag (Chien et al., 2017). Als weitere Erkenntnis scheinen Tumoren einer mFasL-induzierten Apoptose zu entkommen, indem sie es vermehrt zu sFasL spalten lassen (Schneider et al., 1998) und dieses sich anschließend umgekehrt gegen antitumorale Immuneffektorzellen, wie T-Killerzellen richtet (Igney et al., 2000). Ein synthetisch hergestellter Fusionsantikörper kann diese Umwandlung erfolgreich verhindern (Chien et al., 2017). Wie bereits für CTLA4 geschildert gibt es zahlreiche Gründe, warum anders als in den wenigen bereits existierenden Studien in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Korrelationen zwischen der FasL-Expression und den klinischen Patientendaten zum einen und dem Vitamin-D-Serumspiegel zum anderen nachgewiesen werden konnten. Hier sind weiterführende Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven erforderlich, um die Rolle von FasL in der antitumoralen Aktivität des Immunsystems in der Kopf-Hals-Onkologie weiter aufzuklären.

Anhand der Auswertung der FoxP3-IHC Färbungen ließ sich weder im Rahmen der intra- noch der peritumoralen Infiltration der exprimierenden regulatorischer-T-Zellen eine zum Vitamin-D-Status signifikante Korrelation formulieren. Die Überlebensanalysen stellten im Rahmen einer höheren peri- und intratumoralen Infiltration FoxP3⁺-regulatorischer-T-Zellen eine geringe Tendenz hin zu einem verlängerten Gesamtüberleben dar ($p=0,3421$ und $p=0,5964$). FoxP3 wirkt als Transkriptionsfaktor für die regulatorischen T-Zellen über die Immunsuppression und die Unterdrückung der TH1- und TH2-Immunantwort (Kim, 2009; Lafaille & Lafaille, 2009; Rink et al., 2018). In diesem Sinne versuchen Tumoren FoxP3 hochzuregulieren, um eine antitumorale Immunreaktion zu supprimieren. Gemäß den Untersuchungen dieser Arbeit scheint Vitamin-D darauf keinen signifikanten Einfluss zu

haben. Einer anderen Studie nach scheint Vitamin-D die Expression von FoxP3 jedoch wesentlich zu beeinflussen, da das FoxP3-Gen in seiner Promotorregion ein Vitamin-D-Response-Element besitzt (Kang et al., 2012). Entgegen der vermuteten Verminderung scheint ein hoher Vitamin-D-Spiegel die FoxP3-Expression zu steigern und reguliert hierüber zusätzlich die hemmende Wirkung der T^{REG} (Kang et al., 2012). Andere Studien kamen wiederum zu widersprüchlichen Ergebnissen, inwiefern sich die intratumorale FoxP3⁺-T^{REG}-Infiltration positiv oder negativ auf die Prognose von Tumorerkrankungen auswirkt. Während bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen die vermehrte Infiltration zu einer Prognoseverbesserung führte (Alvaro et al., 2005; Yang et al., 2006), zeigte sich bei Ovarialkarzinomen eine Verschlechterung (Curiel et al., 2004; Wolf et al., 2005) und bei Analkarzinomen konnte kein Einfluss der T^{REG} auf die Prognose der Patienten dargestellt werden (Grabenbauer et al., 2006). T^{REG}-Zellen werden teilweise in der Literatur als eine Art Barriere der Anti-Tumor-Immunität beschrieben (Overacre-Delgoffe et al., 2017). Eine Studie von Distel et al. kam zum Ergebnis, dass 2/3 aller intratumoralen CD4⁺-T-Zellen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs aus FoxP3 positiven-T^{REG} bestehen (Distel et al., 2009). Dies konnte dabei im Gegensatz zu einer vorausgehenden Studie von Badoual et al. nicht mit einer verbesserten Überlebensrate und einer gesteigerten Tumorkontrolle in Verbindung gebracht werden (Badoual et al., 2006). Unterschiede wurden zwischen Niedrig- und Hochrisikogruppen beobachtet. So hatte lediglich in ersterem eine hohe FoxP3-Infiltration einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten (Distel et al., 2009). Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten einen Erklärungsansatz für die uneindeutigen Beobachtungen dieser Arbeit darstellen und veranschaulichen die Dringlichkeit weiterer Forschungen, um die genaue Funktion dieser das immunologische Tumor-Mikromilieu von Kopf-Hals-Tumorpatienten dominierenden Zellpopulation aufzuklären.

Die statistische Analyse der IL10-Expression zeigte vergleichbar zu den beiden zuvor genannten molekularen Markern keine signifikanten Ergebnisse. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Vitamin-D-Versorgungsstatus und der Expression der intra- bzw. peritumoralen, löslichen oder membrangebundenen Form nachgewiesen werden. Auch das Gesamtüberleben stellte sich in Abhängigkeit der Infiltration des Tumors oder des peritumoralen Stromas mit IL10-exprimierenden Zellen im untersuchten Kollektiv nicht signifikant verändert dar. Das hauptsächlich von TH2- und T^{REG}-Zellen produzierte IL10 wirkt über eine gesteigerte TH2- und gedrosselte TH1- und TH17-Antwort. Hierdurch erreicht es insgesamt eine Immunsuppression und gleichzeitig über die TH2-Antwort eine Vermehrung und gesteigerte Differenzierung von B-Lymphozyten (Rink et al., 2018). Zudem fördert es die Vermehrung zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen (Chen & Zlotnik, 1991; MacNeil et al., 1990) und verhindert die Antigenpräsentation über die Hemmung von Makrophagen und dendritischen

Zellen bzw. unterstützt lediglich eine tolerogene Präsentation (Ng et al., 2013; Rink et al., 2018). Im Interesse von Tumoren wäre somit die Steigerung der IL10-Expression, indem durch die Immunsuppression die antitumorale Immunantwort verhindert wird. Gleichzeitig kommt es aber zur gesteigerten Aktivität von T-Killerzellen und zur vermehrten Aktivität von B-Lymphozyten, was wiederum die ungestörte, tumorale Proliferation hemmen würde. Diese ambivalenten Wirkungen des IL10 bieten neben der Tatsache, dass dessen Expression stark altersabhängig ist (Rink et al., 2018), einen Erklärungsansatz für die uneindeutigen Ergebnisse zu IL10 in dieser Arbeit. Zudem scheint Vitamin-D, gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit, auf die Expression von IL10 keinen signifikanten Einfluss zu haben. Im Gegensatz dazu konnte, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, in anderen Studien eine Steigerung der IL10-Sekretion durch Vitamin-D beobachtet werden (Adorini et al., 2003; Boonstra et al., 2001). Es konnte allgemein bei HNSCC Patienten eine Verschiebung hin zu TH2- und weg von TH1-Zellen festgestellt werden (Lathers et al., 2003). Diese Beobachtung würde auch genau der Wirkung von IL10 entsprechen. Daneben konnte IL10 in der Tumormikroumgebung vieler Krebsarten nachgewiesen und mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (X. Wang et al., 2019). In einem Mausmodell führte eine erhöhte Expression von IL10 dazu, dass ein eigentlich immunogener Tumor nicht vom körpereigenen Immunsystem kontrolliert werden konnte (X. Wang et al., 2019). Widersprüchlich dazu traten in anderen Studien bei Menschen und Mäusen mit einem IL10-Mangel vermehrt Tumorerkrankungen und entzündliche Darmerkrankungen auf (Berg et al., 1996; Neven et al., 2013). Dies wurde von den Autoren durch die ausbleibende stimulierende Wirkung von IL10 auf zytotoxische CD8⁺-T-Zellen und eine Fehlen der entzündungshemmenden Wirkung erklärt (Chen & Zlotnik, 1991; MacNeil et al., 1990). IL10 scheint also zusammenfassen eine zwiespaltene Rolle in der Krebsentstehung- und Progression zu spielen. Die antientzündliche Wirkung wurde in einer anderen Studie allerdings auch als Schutz vor Tumoren aufgefasst, da sie das Fortschreiten von Tumoren auch begünstigen kann (Oft, 2014). Grund für die verschiedenen Ergebnisse rund um IL10 könnte zudem ein Polymorphismus des IL10-Gens sein (W Martin Howell & Rose-Zerilli, 2007). So konnten in mehreren Studien Assoziationen zwischen dem IL10-Genotyp und einer Tumorerkrankung festgestellt werden. Bei Krebsarten wie dem malignen Melanom oder dem Nierenzellkarzinom war dabei ein Genotyp, der zu einer niedrigen IL10-Expression führte, ein negativer prognostischer Faktor (Havranek et al., 2005; W M Howell et al., 2001), bei anderen wie Gebärmutterhalskrebs stellten wiederum hohe Expressionen einen Risikofaktor dar (Stanczuk et al., 2001). Limitiert sind diese Ergebnisse allerdings durch relativ kleine Stichprobengrößen. Diese vielseitigen und teils widersprüchlichen Erkenntnisse zu IL10 bieten zusammenfassend einen Erklärungsansatz für die uneindeutigen Daten der

5. Diskussion

Untersuchungen dieser Arbeit wie auch der bereits existierenden Literatur und unterstreichen daher die Dringlichkeit weiterer Forschungen.

All diese Ergebnisse veranschaulichen, dass Vitamin-D nicht nur das Infiltrationsverhalten der Leukozyten im Tumor selbst sowie im Tumor Microenvironment beeinflusst (Bochen et al., 2018), sondern auch eine regulierende Wirkung auf die Expression bestimmter leukozytärer Moleküle hat. Auch im Rahmen der Dissertationsarbeit von Frau Dr. med. Jule Balensiefer („Einfluss von Vitamin D auf die lytische Signatur tumorinfiltrierender Leukozyten bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich“, Universität des Saarlandes, Homburg), konnte ein steigernder Effekt von Vitamin-D auf die Expression bestimmter Effektormoleküle und die zytolytische Aktivität von Leukozyten nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Auswertung der Überlebensdaten des vorliegenden Kollektivs zeigte sich bei den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($p=0,0233$). Ursache hierfür könnte zum einen die gesteigerte Leukozyteninfiltration sein (Bochen et al., 2018), zum anderen aber auch der zum Teil nachgewiesene Einfluss von Vitamin-D auf die Expression der leukozytären Moleküle. Diese Betrachtungen scheinen vielversprechende Ansätze für die Verbesserung der bisher sehr niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate der HNSCC-Patienten von lediglich 55% darzustellen. Auch die in anderen Studien nachgewiesene, synergistische Wirkung von Vitamin-D und Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Therapie menschlicher Tumorerkrankungen motivieren weiter zu einem klinischen Einsatz dieser Substanz als Teil eines multimodalen Therapiekonzepts.

Letztendlich ist die Betrachtung der Immunhistochemie nicht ausreichend, um die molekularen Expressionsmechanismen der Moleküle genau analysieren zu können, sodass weitere, insbesondere molekulargenetische und molekularbiologische Untersuchungen nötig sind. Gegenstand zukünftiger Forschungen sollten die potenziellen Therapiemöglichkeiten sein, die sich bei näherer Betrachtung der einzelnen Moleküle ergeben könnten.

Kritisch anzumerken ist, dass das in dieser Arbeit analysierte Patientenkollektiv hinsichtlich der individuellen Patienteneigenschaften wie Alkohol- und Nikotinkonsum, HPV-Assoziation der Tumorerkrankung, Vitamin-D-Ausgangslevel und Essgewohnheiten sehr heterogen ist. Dies erschwert, zusätzlich zur begrenzt großen Stichprobengröße ($n=116$), die Darstellung von Vitamin-D als unabhängigen prognostischen Faktor. Notwendig für eine sinnvolle Multivarianz-Analyse wäre ein größeres und in den Patientencharakteristika homogeneres Kollektiv.

Nichtsdestotrotz ist gemäß der in dieser Arbeit erhobenen Daten ein positiver Effekt von Vitamin-D auf das Gesamtüberleben und die Prognose der Patienten mit

Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs darstellbar. Zusätzlich konnte teilweise auch eine Steigerung der Expression leukozytärer Moleküle nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass Vitamin-D durch Förderung der antitumoralen Abwehr einer Tumorprogression entgegenwirkt und diese effektiv herauszögern kann. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Molekülen der Leukozyten, existieren in der Mikroumgebung der Tumoren weitere Mediatoren, die an der effektiven Tumorbekämpfung beteiligt sind. Diese perspektivisch zu analysieren, könnte das Verständnis rund um Vitamin-D und seinen Einfluss auf die Immunzellen im Rahmen einer antitumoralen Reaktion im Kontext der Kopf-Hals-Onkologie verbessern.

Nach Betrachtung aller bisheriger Ansatzpunkte und der Auswertung aller in dieser Arbeit erhaltenen Daten, kommt man zum Fazit, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung zu einem signifikanten Überlebensvorteil von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs führt. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass Vitamin-D die Infiltration von Leukozyten und die Expression bestimmter leukozytärer Effektormoleküle reguliert und somit deren Aktivität beeinflusst. Der Vitamin-D-Status sollte bei Kopf-Hals-Tumorpatienten demnach vermehrt bestimmt werden und im Falle eines Mangels sollte dieser behoben und langfristig korrekt eingestellt werden. Um weitere Effekte des Vitamin-D im Rahmen der antitumoralen Immunabwehr identifizieren und besser verstehen zu können, sind perspektivisch weitere Studien und Experimente rund um seine immunregulatorische Potenz notwendig. Nur auf diese Weise kann die Effektivität einer Vitamin-D-Substitution als neuer, unterstützender Ansatz der bisherigen Immuntherapien gegen Kopf-Hals-Tumoren bestärkt werden, um letzten Endes die Lebensqualität aber auch das Gesamtüberleben der Patienten zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, J. S., & Hewison, M. (2010). Update in Vitamin D. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(2), 471–478. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1773>
- Adorini, L., Penna, G., Giarratana, N., & Uskokovic, M. (2003). Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, *88*(2), 227–233. <https://doi.org/10.1002/jcb.10340>
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M. T., Bosch, R., García, J. F., Jaén, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalbán, C., & Piris, M. A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(4), 1467–1473. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1869>
- Anand, A., Singh, S., Sonkar, A. A., Husain, N., Singh, K. R., Singh, S., & Kushwaha, J. K. (2013). Expression of vitamin D receptor and vitamin D status in patients with oral neoplasms and effect of vitamin D supplementation on quality of life in advanced cancer treatment. *Contemporary Oncology*, *21*(2), 145–151.
- Anderson, L. N., Cotterchio, M., Vieth, R., & Knight, J. A. (2010). Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, *91*(6), 1699–1707. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28869>
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, *363*(1), 24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
- Arem, H., Weinstein, S. J., Horst, R. L., Virtamo, J., Yu, K., Albanes, D., & Abnet, C. C. (2011). Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in Finnish men. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *20*(6), 1178–1184. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0153>
- Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M., & Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *The Cancer Journal from Scientific American*, *6 Suppl 1*, S11-4.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N. E. H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W. H., Brasnu, D. F., & Tartour, E. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(2), 465–472. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1886>
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, *10*(4), 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
- Balkwill, F., Montfort, A., & Capasso, M. (2013). B regulatory cells in cancer. *Trends in Immunology*, *34*(4), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.007>
- Barrett, M., Foa, R., Brien, S. O., Valente, N., Wenger, M., & Maloney, D. G. (2017). *Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience*. 2232–2273. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0612-x>
- Battault, S., Whiting, S. J., Peltier, S. L., Sadrin, S., Gerber, G., & Maixent, J. M. (2013). Vitamin D metabolism, functions and needs: From science to health claims. *European Journal of Nutrition*, *52*(2), 429–441. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0430-5>
- Ben-Shoshan, M., Amir, S., Dang, D. T., Dang, L. H., Weisman, Y., & Mabeesh, N. J. (2007). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-

- 1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1433–1439. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0677>
- Benchetrit, F., Gazagne, A., Adotevi, O., Haicheur, N., Godard, B., Badoual, C., Fridman, W. H., & Tartour, E. (2003). Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy. *Bulletin du cancer*, 90(8–9), 677–685.
- Berg, D. J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M. W., & Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(4), 1010–1020. <https://doi.org/10.1172/JCI118861>
- Berger, M. D., Stintzing, S., Heinemann, V., Cao, S., Yang, D., Sunakawa, Y., Matsusaka, S., Ning, Y., Okazaki, S., Miyamoto, Y., Suenaga, M., Schirripa, M., Hanna, D. L., Soni, S., Puccini, A., Zhang, W., Cremolini, C., Falcone, A., Loupakis, F., & Lenz, H.-J. (2018). A Polymorphism within the Vitamin D Transporter Gene Predicts Outcome in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated with FOLFIRI/Bevacizumab or FOLFIRI/Cetuximab. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(4), 784–793. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1663>
- Bergmann, C., Strauss, L., Wang, Y., Szczepanski, M. J., Lang, S., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2008). T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: Mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clinical Cancer Research*, 14(12), 3706–3715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5126>
- Bersanelli, M., Cortellini, A., Leonetti, A., Parisi, A., Tiseo, M., Bordi, P., Michiara, M., Bui, S., Cosenza, A., Ferri, L., Giudice, G. C., Testi, I., Rapacchi, E., Camisa, R., Vincenzi, B., Caruso, G., Rauti, A. N., Arturi, F., Tucci, M., ... Buti, S. (2023). Systematic vitamin D supplementation is associated with improved outcomes and reduced thyroid adverse events in patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors: results from the prospective PROVIDENCE study. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 72(11), 3707–3716. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03522-3>
- Blutt, S. E., McDonnell, T. J., Polek, T. C., & Weigel, N. L. (2000). Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*, 141(1), 10–17. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7289>
- Bochen, F., Balensiefer, B., Körner, S., Bittenbring, J. T., Neumann, F., Koch, A., Bumm, K., Marx, A., Wemmert, S., Papaspyrou, G., Zuschlag, D., Kühn, J. P., Al Kadah, B., Schick, B., & Linxweiler, M. (2018). Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients—prevalence, prognostic value and impact on immune function. *Oncolimmunology*, 7(9), 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1476817>
- Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F., & O'Garra, A. (2001). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(9), 4974–4980. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.4974>
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., & Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), 726–776. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>
- Brierly, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Union for International Cancer Control (UICC).
- Bubien, K., Zhou, L., Bell, P. D., & Frizzell, R. A. (1993). *Transfection of the CD20 Cell Surface Molecule into Ectopic Cell Types Generates a Ca Conductance Found Constitutively in B Lymphocytes*. 121(5), 1121–1132.
- Burtness, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G. J., Psyrris,

- A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fuereder, T., Hughes, B. G. M., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W. Z., Hong, R.-L., González Mendoza, R., Roy, A., ... Rischin, D. (2019). Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*, 394(10212), 1915–1928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7)
- Cabrera, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., van Schoiack, A., Lövgren, K., Warren, S., Jirstrom, K., Olsson, H., Pietras, K., Ingvar, C., Isaksson, K., Schadendorf, D., ... Jönsson, G. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*, 577(7791), 561–565. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1914-8>
- Cantorna, M. T. (2010). Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 286–289. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001722>
- Carlberg, C. (2014). The physiology of vitamin D - far more than calcium and bone. *Frontiers in Physiology*, 5 AUG(September), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00335>
- Chen, W. F., & Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(2), 528–534.
- Chien, M.-H., Chang, W.-M., Lee, W.-J., Chang, Y.-C., Lai, T.-C., Chan, D. V., Sharma, R., Lin, Y.-F., & Hsiao, M. (2017). A Fas Ligand (FasL)-Fused Humanized Antibody Against Tumor-Associated Glycoprotein 72 Selectively Exhibits the Cytotoxic Effect Against Oral Cancer Cells with a Low FasL/Fas Ratio. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(6), 1102–1113. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0314>
- Chikamatsu, K., Sakakura, K., Whiteside, T. L., & Furuya, N. (2007). Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 29(2), 120–127. <https://doi.org/10.1002/hed.20490>
- Chung, I., Han, G., Seshadri, M., Gillard, B. M., Yu, W., Foster, B. A., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2009). Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Research*, 69(3), 967–975. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2307>
- Cohen, E. E. W., Soulières, D., Le Tourneau, C., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M.-J., Soria, A., Machiels, J.-P., Mach, N., Mehra, R., Burtness, B., Zhang, P., Cheng, J., Swaby, R. F., & Harrington, K. J. (2019). Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*, 393(10167), 156–167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8)
- Cohen, R. B. (2014). Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer Treatment Reviews*, 40(4), 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.10.002>
- Croce, M., Rigo, V., & Ferrini, S. (2015). IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *Journal of Immunology Research*, 2015, 696578. <https://doi.org/10.1155/2015/696578>
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Krczyk, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942–949. <https://doi.org/10.1038/nm1093>
- Curti, B. D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K.,

- Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwsen, T., Fox, B. A., Moudgil, T., Miller, W., Haley, D., Coffey, T., Fisher, B., Delanty-Miller, L., Rymarchyk, N., Kelly, T., Crocenzi, T., ... Weinberg, A. D. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Research*, 73(24), 7189–7198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4174>
- D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1944–1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- Dasgupta, S., Bhattacharya-Chatterjee, M., O'Malley, B. W. J., & Chatterjee, S. K. (2005). Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(8), 5541–5550. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5541>
- Diaz-Padilla, I., Siu, L. L., & Duran, I. (2009). Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Investigational New Drugs*, 27(6), 586–594. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9236-6>
- Distel, L. V., Fickenscher, R., Dietel, K., Hung, A., Iro, H., Zenk, J., Nkenke, E., Büttner, M., Niedobitek, G., & Grabenbauer, G. G. (2009). Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral Oncology*, 45(10), e167-74. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.05.640>
- Dusso, A. S., Brown, A. J., & Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(1), F8–F28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>
- Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(October 2018), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.102>
- Ferris, R. L. (2015). Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. In *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.1509>
- Ferris, R. L., Blumenschein, G. J., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Iglesias Docampo, L. C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., ... Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England Journal of Medicine*, 375(19), 1856–1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>
- Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., & Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(12), 717–734. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
- Fukuda, R., Kelly, B., & Semenza, G. L. (2003). Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Research*, 63(9), 2330–2334.
- Garland, C. F., Garland, F. C., Gorham, E. D., Lipkin, M., Newmark, H., Mohr, S. B., & Holick, M. F. (2006). *The Role of Vitamin D in Cancer Prevention*. 96(2), 252–261. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.045260>
- Gocek, E., & Studzinski, G. P. (2009). Vitamin D and differentiation in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(4), 190–209. <https://doi.org/10.1080/10408360902982128>
- Gombart, A. F., Borregaard, N., & Koeffler, H. P. (2005). Human cathelicidin antimicrobial

- peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), 1067–1077. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3284com>
- Good-Jacobson, K. L., Szumilas, C. G., Chen, L., Sharpe, A. H., Tomayko, M. M., & Shlomchik, M. J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology*, 11(6), 535–542. <https://doi.org/10.1038/ni.1877>
- Grabenbauer, G. G., Lahmer, G., Distel, L., & Niedobitek, G. (2006). Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(11 Pt 1), 3355–3360. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2434>
- Gugatschka, M., Kiesler, K., Obermayer-Pietsch, B., Groselj-Strele, A., Griesbacher, A., & Friedrich, G. (2011). Vitamin D status is associated with disease-free survival and overall survival time in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology : Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 268(8), 1201–1204. <https://doi.org/10.1007/s00405-010-1481-y>
- Guidi, A., Violati, M., Blasi, M., Ferrari, E., Luciani, A., Codecà, C., & Ferrari, D. (2020). Autoimmune-related encephalitis during treatment with nivolumab for advanced head and neck cancer: a case report. *Tumori*, 106(6), NP23–NP28. <https://doi.org/10.1177/0300891620951262>
- Guyton, K. Z., Kensler, T. W., & Posner, G. H. (2001). *Cancer Chemoprevention Using Natural Vitamin D and Synthetic Analogs*. 2.
- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.-C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., ... Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(2), 541–550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>
- Havranek, E., Howell, W. M., Fussell, H. M., Whelan, J. A., Whelan, M. A., & Pandha, H. S. (2005). An interleukin-10 promoter polymorphism may influence tumor development in renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 173(3), 709–712. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000152493.86001.91>
- Heaney, R. P. (2012). Vitamin D - baseline status and effective dose. In *The New England journal of medicine* (Vol. 367, Issue 1, pp. 77–78). <https://doi.org/10.1056/NEJMe1206858>
- Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A., & Bendich, A. (2003). Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), 142–146. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719287>
- Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (Eds.). (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>
- Hewison, M., Gacad, M. A., Lemire, J., & Adams, J. S. (2001). Vitamin D as a cytokine and hematopoietic factor. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2(2), 217–227. <https://doi.org/10.1023/a:1010015013211>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den

- Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., ... Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Hof, H., Dörries, R., Geginat, G., Schlüter, D., & Wendt, C. (2017). *Medizinische Mikrobiologie*. <https://doi.org/10.1055/b-0036-140997>
- Holick, M. F. (2017). The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 18, Issue 2, pp. 153–165). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9424-1>
- HOLICK, M. F. (1985). The Photobiology of Vitamin D and Its Consequences for Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 453(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb11793.x>
- Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., & Weaver, C. M. (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(7), 1911–1930. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385>
- Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: A worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4). <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.1080s>
- Howell, W M, Turner, S. J., Bateman, A. C., & Theaker, J. M. (2001). IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes and Immunity*, 2(1), 25–31. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363726>
- Howell, W Martin, & Rose-Zerilli, M. J. (2007). Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *The Journal of Nutrition*, 137(1 Suppl), 194S-199S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.194S>
- Igney, F. H., Behrens, C. K., & Krammer, P. H. (2000). Tumor counterattack--concept and reality. *European Journal of Immunology*, 30(3), 725–731. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200003\)30:3<725::AID-IMMU725>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200003)30:3<725::AID-IMMU725>3.0.CO;2-D)
- Jeffery, L. E., Burke, F., Mura, M., Zheng, Y., Qureshi, O. S., Hewison, M., Walker, L. S. K., Lammas, D. A., Raza, K., & Sansom, D. M. (2009). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(9), 5458–5467. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803217>
- Jeffery, L. E., Qureshi, O. S., Gardner, D., Hou, T. Z., Briggs, Z., Soskic, B., Baker, J., Raza, K., & Sansom, D. M. (2015). Vitamin D Antagonises the Suppressive Effect of Inflammatory Cytokines on CTLA-4 Expression and Regulatory Function. *PLoS One*, 10(7), e0131539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131539>
- Joshi, S., Pantalena, L.-C., Liu, X. K., Gaffen, S. L., Liu, H., Rohowsky-Kochan, C., Ichiyama, K., Yoshimura, A., Steinman, L., Christakos, S., & Youssef, S. (2011). 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3653–3669. <https://doi.org/10.1128/MCB.05020-11>
- Jung, M. K., Kwak, J., & Shin, E. (2017). *IL-17A-Producing Foxp3 + Regulatory T Cells and Human Diseases*. 17(5), 276–286.
- Kamal, A., & Khamashta, M. (2014). The efficacy of novel B cell biologics as the future of SLE treatment: a review. *Autoimmunity Reviews*, 13(11), 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.020>
- Kang, S. W., Kim, S. H., Lee, N., Lee, W.-W., Hwang, K.-A., Shin, M. S., Lee, S.-H., Kim, W.-U., & Kang, I. (2012). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. *Journal of*

- Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(11), 5276–5282.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101211>
- Kansy, B., Hussain, T., Mattheis, S., Wollenberg, B., Brandau, S., & Lang, S. (2015). Immuntherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Hno*, 63(11), 797–803.
<https://doi.org/10.1007/s00106-015-0076-8>
- Kasprowicz, D. J., Smallwood, P. S., Tyznik, A. J., & Ziegler, S. F. (2003). Scurfin (FoxP3) Controls T-Dependent Immune Responses In Vivo Through Regulation of CD4 + T Cell Effector Function . *The Journal of Immunology*, 171(3), 1216–1223.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1216>
- Khailaie, S., Rowshanravan, B., Robert, P. A., Waters, E., Halliday, N., David, J., Herrera, B., Walker, L. S. K., Sansom, D. M., & Meyer-hermann, M. (2018). Characterization of CTLA4 Trafficking and Implications for Its Function. *Biophysj*, 115(7), 1330–1343.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.020>
- Kim, C. H. (2009). FOXP3 and its role in the immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 665, 17–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_2
- Kongsbak, M., Von Essen, M. R., Boding, L., Levring, T. B., Schjerling, P., Lauritsen, J. P. H., Woetmann, A., Ødum, N., Bonefeld, C. M., & Geisler, C. (2014). *Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4+ T Cells*. 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096695>
- Lafaille, M. A. C. De, & Lafaille, J. J. (2009). Review Natural and Adaptive Foxp3 + Regulatory T Cells : More of the Same or a Division of Labor ? *Immunity*, 30(5), 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>
- Lathers, D. M. R., Achille, N. J., & Young, M. R. I. (2003). Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Human Immunology*, 64(12), 1160–1166. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.08.024>
- Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattry, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5397), 2263–2266.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2263>
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 9–22.
<https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- Lemire, J. M., Adams, J. S., Sakai, R., & Jordan, S. C. (1984). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(2), 657–661. <https://doi.org/10.1172/JCI111465>
- Liang, S. N., Huang, Y. J., Liu, L. L., & Liu, X. (2015). Study on the correlation between the expression of Ki67 and FasL and prognosis of cervical carcinoma. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 14(3), 8634–8639. <https://doi.org/10.4238/2015.July.31.11>
- Liu, J.-N., Kong, X.-S., Huang, T., Wang, R., Li, W., & Chen, Q.-F. (2020). Clinical Implications of Aberrant PD-1 and CTLA4 Expression for Cancer Immunity and Prognosis: A Pan-Cancer Study. *Frontiers in Immunology*, 11, 2048.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02048>
- Lund, F. E., & Randall, T. D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 10(4), 236–247.
<https://doi.org/10.1038/nri2729>
- MacNeil, I. A., Suda, T., Moore, K. W., Mosmann, T. R., & Zlotnik, A. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(12), 4167–4173.
- Malarkannan, S. (2020). *Molecular mechanisms of FasL-mediated “reverse-signaling”*. 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.08.010>.Molecular

- Mandal, R., Şenbabaoğlu, Y., Desrichard, A., Havel, J. J., Dalin, M. G., Riaz, N., Lee, K.-W., Ganly, I., Hakimi, A. A., Chan, T. A., & Morris, L. G. T. (2016). The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*, *1*(17), 1–18. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>
- Manson, J. E., Cook, N. R., Lee, I.-M., Christen, W., Bassuk, S. S., Mora, S., Gibson, H., Gordon, D., Copeland, T., D'Agostino, D., Friedenberg, G., Ridge, C., Bubes, V., Giovannucci, E. L., Willett, W. C., & Buring, J. E. (2019). Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, *380*(1), 33–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809944>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Matsuoka, L. Y., Ide, L., Wortsman, J., MacLaughlin, J. A., & Holick, M. F. (1987). Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *64*(6), 1165–1168. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-6-1165>
- McCoy, K. D., & Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. In *Immunology and Cell Biology* (Vol. 77, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00795.x>
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2017). Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*, *389*(10086), 2328–2337. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31472-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31472-1)
- Mehra, R., Huang, H., Seal, B., Tse, J., Shenolikar, R. A., & Burudpakdee, C. (2020). Real-world treatment patterns for patients with metastatic head and neck squamous cell carcinoma treated with immuno-oncology therapy. *Head & Neck*, *42*(8), 2030–2038. <https://doi.org/10.1002/hed.26126>
- Meyer, F., Liu, G., Douville, P., Samson, É., Xu, W., Adjei, A., & Bairati, I. (2011). Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *International Journal of Cancer*, *128*(7), 1741–1746. <https://doi.org/10.1002/ijc.25496>
- Milo, R. (2016). Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, *15*(7), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.03.006>
- Mora, J. R., Iwata, M., & von Andrian, U. H. (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(9), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nri2378>
- Moreno, J., Krishnan, A. V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2005). Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Research*, *65*(17), 7917–7925. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1435>
- Nagata, S., & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science (New York, N. Y.)*, *267*(5203), 1449–1456. <https://doi.org/10.1126/science.7533326>
- Neven, B., Mamessier, E., Bruneau, J., Kaltenbach, S., Kotlarz, D., Suarez, F., Masliah-Planchon, J., Billot, K., Canioni, D., Frange, P., Radford-Weiss, I., Asnafi, V., Murugan, D., Bole, C., Nitschke, P., Goulet, O., Casanova, J.-L., Blanche, S., Picard, C., ... Fischer, A. (2013). A Mendelian predisposition to B-cell lymphoma caused by IL-10R deficiency. *Blood*, *122*(23), 3713–3722. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508267>
- Ng, T. H. S., Britton, G. J., Hill, E. V., Verhagen, J., Burton, B. R., & Wraith, D. C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology*, *4*(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
- Nowak, J., Bentele, M., & Kutle, I. et al. (2023). CAR-NK Cells Targeting HER1 (EGFR) Show Efficient Anti-Tumor Activity against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *Cancers*, *15*(12). <https://doi.org/10.3390/cancers15123169>

- O' Reilly, L. A., Tai, L., Lee, L., Kruse, E. A., Grabow, S., Fairlie, W. D., Haynes, N. M., Tarlinton, D. M., Zhang, J.-G., Belz, G. T., Smyth, M. J., Bouillet, P., Robb, L., & Strasser, A. (2009). Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature*, *461*(7264), 659–663. <https://doi.org/10.1038/nature08402>
- Off, M. (2014). IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunology Research*, *2*(3), 194–199. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0214>
- Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Kan, S., Sasai, A., Akashi, S., Miyake, K., Moriya, Y., Ryoma, Y., Saito, M., & Sato, M. (2006). Mechanism of anticancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signaling. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *29*(1), 78–86. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000192106.32206.30>
- Orell-Kotikangas, H., Schwab, U., Österlund, P., Saarilahti, K., Mäkitie, O., & Mäkitie, A. A. (2012). High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis. *Head & Neck*, *34*(10), 1450–1455. <https://doi.org/10.1002/hed.21954>
- Overacre-Delgoffe, A. E., Chikina, M., Dadey, R. E., Yano, H., Brunazzi, E. A., Shayan, G., Horne, W., Moskovitz, J. M., Kolls, J. K., Sander, C., Shuai, Y., Normolle, D. P., Kirkwood, J. M., Ferris, R. L., Delgoffe, G. M., Bruno, T. C., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2017). Interferon- γ Drives T(reg) Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell*, *169*(6), 1130–1141.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.005>
- Paleri, V., Mehanna, H., & Wight, R. G. (2010). TNM classification of malignant tumours 7th edition: what's new for head and neck? In *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* (Vol. 35, Issue 4, pp. 270–272). <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2010.02141.x>
- Pannen, B. H., & Robotham, J. L. (1995). The acute-phase response. *New Horizons (Baltimore, Md.)*, *3*(2), 183–197.
- Pardoll, D. M., & Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, *10*(5), 588–594. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80228-8](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80228-8)
- Pavlasova, G., & Mraz, M. (2020). The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, *105*(6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>
- Pouw, R. B., & Ricklin, D. (2022). Tipping the balance : intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Seminars in Immunopathology*, *2021*, 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00892-7>
- Priehl, B., Treiber, G., Pieber, T. R., & Amrein, K. (2013). Vitamin D and immune function. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 7, pp. 2502–2521). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>
- Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., & Blecha, F. (2002). Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes and Infection*, *4*(3), 361–372. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01549-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01549-6)
- Ramqvist, T., & Dalianis, T. (2010). Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(11), 1671–1677. <https://doi.org/10.3201/eid1611.100452>
- Reiß, M. (2021). *Facharztwissen HNO-Heilkunde, Differenzierte Diagnostik und Therapie, 2. Auflage*. Reiß, Michael.
- Rink, L., Kruse, A., & Haase, H. (2018). *Immunologie für Einsteiger 2. Auflage*.
- Robert Koch-Institut. (2016). *Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019. Robert Koch-Institut.*

- Robert Koch-Institut. (2020). *Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2023.*
- Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*, 238(2), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.02.005>
- Rotte, A. (2019). Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1259-z>
- Russell, S. M., Lechner, M. G., Gong, L., Megiel, C., Liebertz, D. J., Masood, R., Correa, A. J., Han, J., Puri, R. K., Sinha, U. K., & Epstein, A. L. (2011). USC-HN2, a new model cell line for recurrent oral cavity squamous cell carcinoma with immunosuppressive characteristics. *Oral Oncology*, 47(9), 810–817. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.05.015>
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 10(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>
- Schmoll, H.-J. (2020). *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Verlag.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., & Tschopp, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1205–1213. <https://doi.org/10.1084/jem.187.8.1205>
- Sharifi, A., Vahedi, H., Honarvar, M. R., Alipoor, B., Nikniaz, Z., Rafiei, H., & Hosseinzadeh-Attar, M. J. (2019). Vitamin D Increases CTLA-4 Gene Expression in Patients with Mild to Moderate Ulcerative Colitis. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 11(4), 199–204. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2019.149>
- Sharma, K., Wang, R. X., Zhang, L. Y., Yin, D. L., Luo, X. Y., Solomon, J. C., Jiang, R. F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D. W., & Shi, Y. F. (2000). Death the Fas way: Regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 88, Issue 3, pp. 333–347). [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00096-6)
- Shimizu, J., Yamazaki, S., & Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), 5211–5218.
- Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). *The molecular landscape of head*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>
- Stanczuk, G. A., Sibanda, E. N., Perrey, C., Chirara, M., Pravica, V., Hutchinson, I. V., & Tswana, S. A. (2001). Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *International Journal of Cancer*, 94(6), 792–794. <https://doi.org/10.1002/ijc.1543>
- Stucci, L. S., D’Oronzo, S., Tucci, M., Macerollo, A., Ribero, S., Spagnolo, F., Marra, E., Picasso, V., Orgiano, L., Marconcini, R., De Rosa, F., Di Guardo, L., Galli, G., Gandini, S., Palmirotta, R., Palmieri, G., Queirolo, P., & Silvestris, F. (2018). Vitamin D in melanoma: Controversies and potential role in combination with immune check-point inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, 69, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.016>
- Tabasi, N., Rastin, M., Mahmoudi, M., Ghoryani, M., Mirfeizi, Z., Rabe, S. Z. T., & Reihani, H. (2015). Influence of vitamin D on cell cycle, apoptosis, and some apoptosis related molecules in systemic lupus erythematosus. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(11), 1107–1111.
- Tedder, T. F., Streuli, M., Schlossman, S. F., & Saito, H. (1988). Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes

- (lymphocyte differentiation antigen/gene expression/in vitro translation). *Immunology*, 85(January), 208–212. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.208>
- Tretli, S., Schwartz, G. G., Torjesen, P. A., & Robsahm, T. E. (2012). Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: A population-based study. *Cancer Causes and Control*, 23(2), 363–370. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9885-6>
- Van Schoor, N. M., & Lips, P. (2011). Worldwide vitamin D status. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(4), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.06.007>
- Vaughan-Shaw, P. G., O'Sullivan, F., Farrington, S. M., Theodoratou, E., Campbell, H., Dunlop, M. G., & Zgaga, L. (2017). The impact of Vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: Systematic review and meta-Analysis. *British Journal of Cancer*, 116(8), 1095–1110. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.44>
- Vieth, R. (2007). *Vitamin D Toxicity, Policy, and Science*. 22, 64–68. <https://doi.org/10.1359/JBMR.07S221>
- Vonderheide, R. H. (2018). The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. *Cancer Cell*, 33(4), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.008>
- Walker, D. D., Reeves, T. D., de Costa, A.-M., Schuyler, C., & Young, M. R. I. (2012). Immunological modulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine*, 58(3), 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.002>
- Wang, T.-T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J. W., Mader, S., & White, J. H. (2004). Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(5), 2909–2912. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>
- Wang, X., Wong, K., Ouyang, W., & Rutz, S. (2019). *Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases*. 1–30. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028548>
- Welsh, J. (2012). Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.019>
- Wild, C. A., Brandau, S., Lindemann, M., Lotfi, R., Hoffmann, T. K., Lang, S., & Bergmann, C. (2010). Toll-like receptors in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 136(12), 1253–1259. <https://doi.org/10.1001/archoto.2010.195>
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5899), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
- Wittekind, C., & Oberschmid, B. (2010). *TNM-klassifikation maligner tumoren 2010. Allgemeine aspekte und nderungen im allgemeinen teil*. Der Pathologe.
- Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., & Marth, C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(23), 8326–8331. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1244>
- Wolff, K.-D., Follmann, M., & Nast, A. (2012). The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(48). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0829>
- Wollenberg, B. (2019). PD-1 antibodies in head-and-neck cancer. *Lancet (London, England)*,

- 393(10167), 108–109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32346-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32346-8)
- World Health Organization. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Wouters, M. C. A., & Nelson, B. H. (2018). Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(24), 6125–6135. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1481>
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Magro, C. M., St Clair, E. W., & Tedder, T. F. (2008). B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 223, 284–299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00646.x>
- Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2006). Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107(9), 3639–3646. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3376>
- Yokota, T., Homma, A., Kiyota, N., Tahara, M., Hanai, N., Asakage, T., Matsuura, K., Ogawa, T., Saito, Y., Sano, D., Kodaira, T., Motegi, A., Yasuda, K., Takahashi, S., Tanaka, K., Onoe, T., Okano, S., Imamura, Y., Ariizumi, Y., & Hayashi, R. (2020). Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 50(10), 1089–1096. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa139>
- Yokota, T., Ota, Y., Fujii, H., Kodaira, T., Shimokawa, M., Nakashima, T., Monden, N., Homma, A., Ueda, S., & Akimoto, T. (2021). Real-world clinical outcomes and prognostic factors in Japanese patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck treated with chemotherapy plus cetuximab: a prospective observation study (JROSG12-2). *International Journal of Clinical Oncology*, 26(2), 316–325. <https://doi.org/10.1007/s10147-020-01817-4>
- Zittermann, A., Prokop, S., Gummert, J. F., & Börgermann, J. (2013). Safety issues of vitamin D supplementation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(1), 4–10.
- Zumbach, K., Hoffmann, M., Kahn, T., Bosch, F., Gottschlich, S., Görögh, T., Rudert, H., & Pawlita, M. (2000). Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 85(6), 815–818. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000315\)85:6<815::aid-ijc14>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000315)85:6<815::aid-ijc14>3.0.co;2-x)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nach Geschlecht differenzierte, altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate (je 100.000) für maligne Tumoren der Mundhöhle und des Rachens.

Gesammelt wurden die Daten in Deutschland, zwischen 1999-2020/2021. Abbildung modifiziert nach der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregisterdaten, 2020 (Robert Koch-Institut, 2020). 7

Abbildung 2: Induktion von T^{REG}-Zellen und Wirkung auf weitere CD4⁺-T-Zellen. Im linken Teil der Abbildung ist dargestellt, wie eine dendritische Zelle einer CD4⁺-T-Zelle Peptide präsentiert, gegen die keine Immunantwort ausgelöst werden soll, da sie beispielsweise körpereigen sind. Die TH0-Zelle wird so zur T^{REG}-Zelle. Diese wiederum supprimiert eine Immunantwort, indem sie unter anderem IL10 sezerniert, welches hemmend auf TH1- und TH2- Zellen wirkt. Abbildung modifiziert nach Hof et al. 2017 (Hof et al., 2017). 22

- Abbildung 3: Dargestellt ist der durchschnittliche 25-OH-Vitamin-D-Spiegel eines Kollektivs mit und ohne Kopf-Hals-Tumoren sowie dessen Einfluss auf die Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren und das Auftreten von befallenen Lymphknoten.** Bild A zeigt den durchschnittlichen Vitamin-D-Serumspiegel der HNSCC-Patienten ($x = 14,1$) und Bild B den der Kontrollpatienten ($x = 23,7$). Bild C stellt die Daten der Bilder A und B in einem Boxplot gegenüber und resultiert in einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,0001$). Bild D bildet mit einer statistischen Signifikanz von $p = 0,0152$ die vom Vitamin-D-Serumspiegel abhängigen Unterschiede in der Anzahl der befallenen Lymphknoten mithilfe von Boxplots ab. Abbildung modifiziert nach Bochen et al. 2018 (Bochen et al., 2018).28
- Abbildung 4: Darstellung der Etablierungsreihe des Antikörpers CD20:** In Bild A ist der erste Etablierungsversuch mit einer 16-minütigen Demaskierungszeit, einem Puffer von pH 9 und einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 dargestellt. Die weiteren Bilder B, C und D zeigen weitere Anpassungen an dem Tonsillenpräparat unter den in den jeweiligen Bildern angegebenen Färbebedingungen.....39
- Abbildung 5: Verteilung der Geschlechter des Patientenkollektivs.** Darstellung als Säulendiagramm. 95 der 116 Patienten waren männlich, 21 waren weiblich.49
- Abbildung 6: HPV-Status-Verteilung des Patientenkollektivs.** Darstellung mit Hilfe eines Säulendiagramms. 95 der 116 HNSCC-Patienten waren HPV-negativ, 21 waren HPV-positiv.49
- Abbildung 7: Statistische Auswertung der Verteilung der Tumorlokalisation.** Darstellung mit Hilfe eines Säulendiagramms. In absteigender Häufigkeit zeigen sich die folgenden Primärtumorlokalisationen: Larynx- ($n=29$), Tonsillen- ($n=26$), Hypopharynx- ($n=22$), Zungengrund- ($n=21$), Zungen- ($n=10$), Mundboden- ($n=5$), Weichgaumen- ($n=2$) und Wangenkarzinom ($n=1$).50
- Abbildung 8: Statistische Auswertung des Tumoranteils (A) und des Stromaanteils (B) der Präparate.** Die Gewebeanteile wurden anhand einer Skala von 1 bis 4 eingeteilt und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen die 1,5-fache Interquartilsrange (nach Tukey) dar. VDA repräsentiert das Kollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und VDM das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel (Daten in Anlehnung an die Dissertation von Dr. med. Benedikt Balensiefer, 2017).51
- Abbildung 9: Statistische Auswertung des T-Stadiums der HNSCC-Patienten.** Darstellung der T-Stadien in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status mit Hilfe eines Balkendiagramms. Jeder Balken repräsentiert dabei einen eigenen prozentualen Anteil an den T-Stadien. Es wurde außerdem zwischen Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel (VDA) und Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) unterschieden.52
- Abbildung 10: Statistische Auswertung der N-Stadien der HNSCC-Patienten.** Darstellung der N-Stadien in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status mit Hilfe eines Balkendiagramms. Jeder Balken repräsentiert dabei einen eigenen prozentualen Anteil an den N-Stadien. Es wurde außerdem zwischen Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel (VDA) und Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel unterschieden.53
- Abbildung 11: Immunhistochemische Detektion von CD20⁺-B-Zellen an HNSCC-Tumorproben.** Dargestellt sind in der oberen Reihe HNSCC-Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM), sowie darunter Proben von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Verglichen werden außerdem die intratumorale sowie die peritumorale B-Zell-Infiltration. Antikörper spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.55
- Abbildung 12: Statistische Auswertung der leukozytären Expression von CD20 im peri- und intratumoralen Gewebe im Verhältnis zum Vitamin-D-Status.** Mit Hilfe eines modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS) konnte die CD20-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots

repräsentieren dabei die einzelnen mIRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.56

Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von CTLA4⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorpräparaten. Dargestellt sind repräsentativ in der oberen Reihe zwei HNSCC-Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM), sowie darunter Proben von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Verglichen wurden zusätzlich die intratumorale sowie die peritumorale Infiltration. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.....57

Abbildung 14: Statistische Auswertung der CTLA4-Expression der infiltrierenden Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die CTLA4-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.58

Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung mFasL⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, stellen die unteren beiden Präparate die Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status dar. Zusätzlich wird von links nach rechts die peritumoral lokalisierte von der intratumoral lokalisierten Form unterschieden. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.59

Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung des löslichen FasL an HNSCC-Tumorproben. Verglichen werden repräsentativ die Expression des löslichen FasL peri- und intratumoral bei einem Vitamin-D-Mangel-Patienten (VDM) und einem Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA). Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt. 100-fache Vergrößerung.60

Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung des löslichen FasL an HNSCC-Tumorproben. Vergleich der peritumoralen und intratumoralen Expression von löslichem FasL bei einem Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung in 500-facher Vergrößerung.60

Abbildung 18: Statistische Auswertung der Infiltration mFasL exprimierender Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die mFasL-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.62

Abbildung 19: Statistische Auswertung der Lokalisation des löslichen FasL im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die sFasL-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.62

Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung FoxP3⁺-Leukozyten an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, stellen die unteren beiden Präparate Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status dar. Zusätzlich wird von links nach rechts das peritumorale vom

intratumoralen Färbeverhalten unterschieden. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.63

Abbildung 21: Statistische Auswertung der FoxP3-Expression tumorassoziierter Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe eines modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS) konnte die FoxP3-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.64

Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von membrangebundenem IL10 an Leukozyten in HNSCC-Tumorproben. Verglichen werden repräsentativ die lokalisierten Färbeformen im peritumoralen Gewebe, sowie jene intratumoral. Die oberen beiden Bilder stellen Proben von Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) dar, während die untere Reihe Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status (VDA) zeigt. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.65

Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung des löslichen IL10 an HNSCC-Tumorproben. Während die obere Reihe Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) repräsentiert, gehören die unteren beiden Präparate zu einem Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Status. Es wird zusätzlich von links nach rechts zwischen der sezernierten Färbeform intra- und peritumoral unterschieden. Antikörper-spezifische Reaktionen werden durch ein rotes Färbesignal dargestellt.66

Abbildung 24: Statistische Auswertung der Infiltration IL10 exprimierender Leukozyten im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die IL10-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.67

Abbildung 25: Statistische Auswertung der Expression des löslichen IL10 im peri- und intratumoralen Gewebe in Korrelation zum Vitamin-D-Status. Mit Hilfe des Immunreaktiven Scores konnte die IL10-spezifische Färbung quantifiziert, ausgewertet und hier in einem Dotplot grafisch dargestellt werden. Die Dots repräsentieren dabei die einzelnen IRS-Werte der eingeschlossenen Patienten, die roten, durchgezogenen Linien die Box und somit den Interquartilsabstand. Die breiteste, horizontale rote Linie veranschaulicht den Median, der untere bis zum oberen Whisker das Minimum bis zum Maximum. Zusätzlich wurden Vitamin-D-Mangel-Patienten von Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung abgegrenzt.68

Abbildung 26: Einfluss des Vitamin-D-Status auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten. Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve für das Patientenkollektiv in Abhängigkeit, ob ein Patient einen Vitamin-D-Mangel oder eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung aufwies. Schwarze Punkte symbolisieren zensierte Daten.69

Abbildung 27: Einfluss des Ausmaßes der Infiltration der leukozytären Populationen bzw. der Expression der analysierten, regulatorischen Moleküle auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten. Dargestellt sind vierzehn Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Patientenkollektivs, in Abhängigkeit von der Höhe der peritumoralen Infiltration CD20, CTLA4, FoxP3, FasL und IL10 exprimierender Zellen (A, C, E, G, I, K, M) und des Ausmaßes der intratumoralen Infiltration (B, D, F, H, J, L, N). Schwarze Punkte symbolisieren zensierte Daten.72

8. Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabelle 1: | Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellernachweis | 33 |
| Tabelle 2: | Chemikalien und Herstellernachweis..... | 34 |
| Tabelle 3: | Lösungen und Puffer mit ihrer Zusammensetzung | 34 |
| Tabelle 4: | Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben | 35 |
| Tabelle 5: | Ablauf des Reagenz-Transferprozesses zur Fixierung des Gewebes..... | 36 |
| Tabelle 6: | Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbung | 40 |
| Tabelle 7: | Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (n=63)..... | 44 |
| Tabelle 8: | Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (n=53)..... | 46 |

9. Publikationen

Einfluss von Vitamin-D auf die Zusammensetzung regulatorischer Populationen tumorinfiltrierender Leukozyten und deren Effektormoleküle bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs

Franziska Sterkel, Sandrina Körner, Silke Wemmert, Florian Bochen, Matthias Wagner, Maximilian Linxweiler

Abstract eingereicht zur Präsentation auf der 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, 28. bis 31. Mai 2025, Frankfurt

Publikation als Originalarbeit in Vorbereitung

10. Danksagung

Das Verfassen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wäre ohne die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft einiger Personen nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick (Lehrstuhlinhaber der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Aufnahme und die Überlassung des Arbeitsplatzes bedanken, sodass es mir möglich war diese Arbeit zu verfassen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes), der mir dieses interessante Thema überließ, mich vertrauensvoll unterstützte und mir mit seiner stets schnellen Hilfe zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön gilt zudem meinem ehemaligen Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Florian Bochen (ehemaliger naturwissenschaftlicher Doktorand der Arbeitsgruppe „Kopf-Hals-Onkologie“ der HNO-Klinik des UKS in Homburg, derzeit Postdoc am Institute of Biochemistry and Molecular Medicine der Universität Bern) und meiner aktuellen Betreuerin

Frau Sandrina Körner, die mich beide von Anfang an geduldig, aufgeschlossen, ehrlich und fachkundig unterstützten und jederzeit für Rückfragen und Diskussionen bereitstanden. Dank der Erfahrung der beiden in diesem Themenbereich und den vielen kritischen Impulsen, konnten mir zahlreiche Schritte, Gedanken und Handlungen erleichtert werden, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für das hilfsbereite, angenehme Arbeitsklima und die stetige Unterstützung im Laboralltag danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde. Besonders Frau Monika Hoffmann, Frau Ulrike Bechtel und Frau Carolin Bick danke ich für ihre beschleunigenden Erklärungen und Veranschaulichungen im Rahmen meiner Etablierungen und Versuche.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für Pathologie der Universität des Saarlandes und besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Bohle, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Wagner und Frau Elke Stenzhorn-Niemann für ihr Engagement und die Bereitstellung der Gewebeschnitte bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Mark, der mich stets verständnisvoll ermutigte und besonders in technischen Fragen eine große Unterstützung war, sowie meiner Familie.

11. Lebenslauf

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