

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

**T-Zellerschöpfung und Stroma Seneszenz – Einfluss der
Tumormikroumgebung auf die Tumorzellbiologie und den klinischen Verlauf
von Kopf-Hals-Karzinomen**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Meike Katrin Vorschel
geb. am: 28.04.1996 in Krefeld

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1.	Tabellenverzeichnis	1
2.	Abbildungsverzeichnis	2
3.	Abkürzungsverzeichnis	5
4.	Zusammenfassung	7
5.	Summary	9
6.	Einleitung	10
6.1.	Epidemiologie von Krebserkrankungen.....	10
6.2.	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCCs)	11
6.2.1.	Epidemiologie	11
6.2.2.	Risikofaktoren	13
6.2.3.	Symptome und Diagnostik	16
6.2.4.	Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten	16
6.3.	Tumormikromilieu	18
6.3.1.	Das Immunsystem.....	19
6.3.2.	Stroma Seneszenz	20
6.3.3.	T-Zellerschöpfung.....	23
6.4.	Vitamin D.....	28
6.4.1.	Vitamin D-Metabolismus	28
6.4.2.	Vitamin D-Status in Deutschland	29
6.4.3.	Folgen des Vitamin D-Mangels	30
6.4.4.	Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem.....	30
6.5.	Eigene Fragestellung.....	32
7.	Material und Methoden	34
7.1.	Material und Herstellernachweis	34
7.1.1.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	34
7.1.2.	Chemikalien	34
7.1.3.	Lösungen und Puffer	35
7.1.4.	Primärantikörper	35
7.1.5.	Patientenkollektiv.....	36
7.2.	Immunhistochemische Färbungen	39
7.2.1.	Verwendete Detektionssysteme für die Immunhistochemie	39
7.2.2.	Vorbereitung der Gewebeproben für die immunhistochemischen Färbungen	39

7.2.3.	Etablierung der Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung.....	40
7.2.4.	Immunhistochemische Färbungen	43
7.3.	Analytische Methoden	46
7.3.1.	Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Mikroskop	46
7.3.2.	Statistische Analysen	47
8.	Ergebnisse	49
8.1.	Beschreibung des Patientenkollektivs	49
8.2.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von IL-8	55
8.2.1.	Abhängigkeit der IL-8-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	56
8.2.2.	Abhängigkeit der IL-8-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status	57
8.2.3.	Einfluss der IL-8-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben.....	59
8.3.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von MMP3	61
8.3.1.	Abhängigkeit der MMP3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	62
8.3.2.	Abhängigkeit der MMP3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status	64
8.3.3.	Einfluss der MMP3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben.....	66
8.4.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PD1	68
8.4.1.	Abhängigkeit der PD1-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	69
8.4.2.	Abhängigkeit der PD1-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status	71
8.4.3.	Einfluss der PD1-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben.....	73
8.5.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von TIM 3	75
8.5.1.	Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	76
8.5.2.	Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status	78
8.5.3.	Einfluss der TIM 3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben.....	80
8.6.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von LAG-3.....	82
8.6.1.	Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	83
8.6.2.	Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status	85
8.6.3.	Einfluss der LAG-3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben.....	87
9.	Diskussion	90

9.1. Tumormikroumgebung und Bedeutung der Stroma Seneszenz und T-Zellerschöpfung	90
9.2. Analyse des untersuchten Patientenkollektivs.....	93
9.3. Abhängigkeit der Antikörper-Expression vom HPV- und Vitamin D-Status	95
9.4. Prognostische Relevanz der Surrogatmarker der Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) für Kopf-Hals-Tumore	97
9.5. Prognostische Relevanz der Surrogatmarker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) für Kopf-Hals-Tumore	102
9.6. Fazit und Ausblick	108
10. Literaturverzeichnis	111
11. Publikationen.....	142
12. Danksagung.....	143
13. Lebenslauf	144

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Ablauf der körpereigenen Vitamin D-Synthese	29
Tabelle 02: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Hersteller/Herkunft.....	34
Tabelle 03: Verwendete Chemikalien mit Hersteller/Herkunft.....	34
Tabelle 04: Verwendete Lösungen und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung	35
Tabelle 05: Verwendete Primärantikörper	35
Tabelle 06: Patientenkollektiv mit klinisch-pathologischen Daten.....	39
Tabelle 07: Arbeitsschritte zur Gewebefixation	40
Tabelle 08: Retrieval-Puffer, Demaskierungszeit und Verdünnung der Primärantikörper.....	44
Tabelle 09: Arbeitsschritte des Färbeprotokolls	45
Tabelle 10: Zusammensetzung des immunreaktiven Scores (IRS).....	46
Tabelle 12: UICC-Stadien am Beispiel des Larynxkarzinoms.....	52

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2020	11
Abbildung 02: Die weltweit häufigsten Krebsinzidenzen im Jahr 2018.....	13
Abbildung 03: Bilderreihe der Etablierungsversuche des Primärantikörpers MMP3 an Tonsillen aus der Gewebebank des HNO-Labors.....	42
Abbildung 04: Etablierungsversuch des Primärantikörpers MMP3 an Tumormaterial	43
Abbildung 05: 7. Version der TNM-Klassifikation für maligne Kopf-Hals-Tumore	50
Abbildung 06: 7. Version der TNM-Tumorklassifikation für maligne Tumore der Kopf-Hals-Region anhand von Beispielen.....	51
Abbildung 07: Häufigkeiten der Tumorlokalisationen im untersuchten Patientenkollektiv.....	53
Abbildung 08: Geschlechterverteilung und Durchschnittsalter im untersuchten Patientenkollektiv	53
Abbildung 09: Verteilung des HPV-Tumorstatus im untersuchten Patientenkollektiv	54
Abbildung 10: Verteilung des Vitamin D-Status im untersuchten Patientenkollektiv.....	54
Abbildung 11: Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper IL-8	55
Abbildung 12: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der IL-8-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	56
Abbildung 13: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HPV-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch IL-8 ⁺ -Immunzellen	57
Abbildung 14: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der IL-8-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status.....	58
Abbildung 15: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low- HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch IL-8 ⁺ -Immunzellen.....	59
Abbildung 16: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der IL-8-Expression der peritumoralen Immunzellen	60
Abbildung 17: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der IL-8-Expression der intratumoralen Immunzellen	61
Abbildung 18: Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper MMP3	62
Abbildung 19: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der MMP3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	63
Abbildung 20: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC- Patienten mit intratumoraler Infiltration durch MMP3 ⁺ -Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus	64

Abbildung 21: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der MMP3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status.....	65
Abbildung 22: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch MMP3 ⁺ -Immunzellen.....	65
Abbildung 23: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der MMP3-Expression der peritumoralen Immunzellen.....	67
Abbildung 24: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der MMP3-Expression der intratumoralen Immunzellen.....	68
Abbildung 25: Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper PD1.....	69
Abbildung 26: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der PD1-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	70
Abbildung 27: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC-Patienten mit peritumoraler Infiltration durch PD1 ⁺ -Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus	71
Abbildung 28: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der PD1-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status.....	72
Abbildung 29: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch PD1 ⁺ -Immunzellen	72
Abbildung 30: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der PD1-Expression der peritumoralen Immunzellen.	74
Abbildung 31: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der PD1-Expression der intratumoralen Immunzellen.	75
Abbildung 32: Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper TIM 3	76
Abbildung 33: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	77
Abbildung 34: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC-Patienten mit peritumoraler Infiltration durch TIM 3 ⁺ -Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus	78
Abbildung 35: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status.....	79
Abbildung 36: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-high-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch TIM 3 ⁺ -Immunzellen	79
Abbildung 37: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der TIM 3-Expression der peritumoralen Immunzellen.	81

Abbildung 38: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der TIM 3-Expression der intratumoralen Immunzellen	82
Abbildung 39: Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper LAG-3	83
Abbildung 40: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus.....	84
Abbildung 41: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HPV-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch LAG-3 ⁺ -Immunzellen.....	85
Abbildung 42: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status.....	86
Abbildung 43: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-high-HNSCC-Patienten mit peritumoraler Infiltration durch LAG-3 ⁺ -Immunzellen	86
Abbildung 44: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der LAG-3-Expression der peritumoralen Immunzellen	88
Abbildung 45: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der LAG-3-Expression der intratumoralen Immunzellen.....	89

3. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
+, zum Beispiel PD1 ⁺ -Immunzellen	PD1-positive-Immunzellen
<	kleiner als
≥	gleich oder größer als
AK	Antikörper
AP-Puffer	Phosphatase Puffer
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bilat.	bilateral
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CD	Cluster of Differentiation, immunphänotypisches Oberflächenmerkmal
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CIS	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 8
CXCR1, CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1 (bzw. 2)
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
Dr. med.	Doktor der Medizin
Dr. rer. nat.	Doktor der Naturwissenschaften
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Europäischen Arzneimittelagentur
EZM	Extrazellulärmatrix
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
G	Geschlecht
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
ggf.	gegebenenfalls
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
HCV, HBV	Hepatitis-C-Virus, Hepatitis-B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGB1	High Mobility Group Protein 1
HNO	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV ⁻ -Tumor	HPV-negativer Tumor
HPV ⁺ -Tumor	HPV-positiver Tumor
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IgV	Immunglobulin V (variable)
IL	Interleukin

IL-8	Interleukin-8
ipsilat.	ipsilateral
IRS	Immunreaktiver Score
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
lat.	lateralis
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LK	Lymphknoten
med.	medialis
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-3 α	Makrophage inflammatory protein 3 alpha
MMP3	Matrix-Metalloproteinase 3
OPSCC	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma
OS	Overall Survival
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD1	Programmed cell death protein 1
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Proc.	Processus
SL	Stimmlippen
syn.	Synonym
TCGA	Cancer Genome Atlas
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TIM 3	T-cell immunoglobulin and mucin-domaining containing 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM-Klassifikation	Klassifikation zur Einteilung von malignen Tumoren (Tumor, Nodus/Lymphknoten, Metastasen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u/o	und/oder
USA	United States of America
VitD	Vitamin D
vs.	versus (gegen, im Vergleich)
WHO	World Health Organization
x	mal
z.B.	zum Beispiel
μ m	Mikrometer

4. Zusammenfassung

Die Tumormikroumgebung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region stellt sich als komplexes System dar und birgt noch immer offene Fragen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen zellulären und molekularen Strukturen und deren Einflüsse auf die Karzinogenese und den klinischen Verlauf. Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf fünf Biomarker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) und Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) gelenkt, um neue Erkenntnisse über die Tumorbilogie in der Tumormikroumgebung zu erhalten und deren Einfluss auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung zu untersuchen. Zusätzlich wurde ein potenzieller Zusammenhang zwischen der Expression der genannten Biomarker und einer tumorfördernden Schleimhautinfektion durch humane Papillomviren sowie der Vitamin D-Versorgung der Patienten ermittelt. Dazu wurde immunhistochemisch an Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben eines Kollektivs von 116 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, die Expression dieser Biomarker untersucht, semiquantitativ ausgewertet und mit klinisch-pathologischen Daten der Patienten korreliert. Es zeigte sich für die Biomarker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) eine signifikante Korrelation einer gesteigerten Expression auf peritumoralen Immunzellen mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten. Gleiches zeigte sich für die T-Zellerschöpfungsmarker PD1 und TIM 3 auch auf intratumoralen Immunzellen. Die Biomarker der Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) zeigten keine Korrelation zwischen der Expression und dem Gesamtüberleben. Bei HPV⁺-Tumoren kam es intra- und peritumoral zu einer signifikant gesteigerten Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen und TIM 3⁺-Immunzellen, während bei HPV⁻-Tumoren eine gesteigerte intratumorale Infiltration durch MMP3⁺-Immunzellen beobachtet wurde. Die Analysen von Vitamin D als Einflussgröße auf die Biomarker-Expression zeigten statistisch keine signifikanten Ergebnisse, sondern lediglich tendenzielle Beobachtungen hinsichtlich einer gesteigerten Infiltration durch PD1⁺- und TIM 3⁺-Immunzellen bei höheren Vitamin D-Serumwerten der Patienten. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten somit zeigen, dass die Zusammensetzung und Aktivität des immunologischen Tumormikromilieus über die reine Tumorzellbiologie hinausgehend einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region haben. Neben den bereits zugelassenen PD1-Antikörpern sind somit weitere Immuncheckpoints und Immunzellpopulationen vielversprechende Zielstrukturen zukünftiger immunonkologischer Therapieansätze mit dem Ziel die Stroma Seneszenz und T-Zellerschöpfung zu überwinden. Zusätzlich konnte vor allem für die Marker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) ein Potenzial als mögliche prognostische Marker für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region aufgezeigt werden. Die prognostische Aussagekraft dieser Biomarker

kann in Verbindung mit weiterführenden Studien potenziell noch gesteigert werden, sodass eine für den Patienten spürbare Verbesserung des klinischen Therapiemanagements durch eine optimierte Prognoseeinschätzung und mögliche neue immunonkologische Therapieansätze erreicht werden könnte.

5. Summary

The tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinomas presents itself as a complex system and still holds unanswered questions regarding the interactions between different cellular and molecular structures and their influences on carcinogenesis and clinical progression. In this study, we focused on five biomarkers of T-cell exhaustion (PD1, TIM 3, LAG-3) and stromal senescence (IL-8, MMP3) to gain new insights of the tumor biology in the tumor microenvironment and to investigate their influence on the clinical course of tumor disease. In addition, a potential correlation between the expression of these biomarkers and tumor-promoting mucosal infection by the human papillomavirus and vitamin D status of patients was determined. For this purpose, the expression of these biomarkers was investigated by immunohistochemistry on formalin fixed paraffin embedded tissue samples of a collective of 116 patients with squamous cell carcinomas of the head and neck region, evaluated semi quantitatively, and correlated with clinical data of the patients. There was a significant correlation of increased expression on peritumoral immune cells with prolonged overall survival for the biomarkers of T-cell exhaustion (PD1, TIM 3, LAG-3). The same was shown for the T-cell exhaustion markers PD1 and TIM 3 also on intratumoral immune cells. Biomarkers of stromal senescence (IL-8, MMP3) showed no correlation between expression and overall survival. In HPV⁺ tumors, there was significantly increased intratumoral and peritumoral infiltration by PD1⁺ immune cells and TIM 3⁺ immune cells, whereas increased intratumoral infiltration by MMP3⁺ immune cells was observed in HPV⁻ tumors. The analyses of vitamin D as an influencing variable on biomarker expression did not show statistically significant results, but only tendential observations regarding an increased infiltration by PD1⁺ and TIM 3⁺ immune cells at higher vitamin D serum levels of the patients. Thus, the studies in this work were able to show that the composition and activity of the immunological tumor microenvironment have a significant impact on the prognosis of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck region beyond the mere tumor cell biology. In addition to the already approved PD1 antibodies, other immune checkpoints and immune cell populations are promising targets of future immuno-oncological therapeutic approaches aiming to overcome stromal senescence and T-cell exhaustion. Especially for the markers of T-cell exhaustion (PD1, TIM 3, LAG-3) a potential as possible prognostic markers for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region could be demonstrated. The prognostic value of these biomarkers can potentially be increased in conjunction with further studies, so that ultimately a noticeable improvement in clinical therapy management for the patient could be achieved through optimized prognosis assessment and possible new immuno-oncological therapy approaches.

6. Einleitung

6.1. Epidemiologie von Krebserkrankungen

Es ist bedeutsam zu verstehen, woran und warum Menschen sterben, um ihnen ein besseres Leben mit einer höheren Lebensqualität zu ermöglichen. Die Wirksamkeit des Gesundheitssystems kann mit Analysen der Todesursachen optimiert und somit können Ressourcen sinnvoll verteilt werden. Je nach Alter, Geschlecht und geographischer Lage unterscheiden sich die Häufigkeiten verschiedener Todesursachen und mithilfe der Internationalen Klassifikation der Krankheiten (ICD-11) kann die Datenverarbeitung verbessert werden. Die ICD-11 ist eine digitale Plattform, in welcher die Daten der Todesursachen international standardisiert gemeldet werden und dadurch eine systematische Erfassung aller Gesundheitsinformationen weltweit erleichtert wird (WHO, 2020).

Im Jahr 2019 starben weltweit 55,4 Millionen Menschen, wobei für 55% dieser Sterbefälle die zehn häufigsten Todesursachen verantwortlich waren (WHO, 2020). Dazu werden laut der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) vor allem ischämische Herzkrankheiten, Schlaganfälle, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen und Infektionen der unteren Atemwege gezählt. Auf dem sechsten Platz dieser statistischen Auflistung der weltweit häufigsten Todesursachen liegen bösartige Neubildungen der Luftröhre, des Bronchialsystems und der Lunge. Die Zahl dieser Krebs-Todesfälle ist von 1,2 Millionen auf 1,8 Millionen gestiegen, wodurch es umso wichtiger erscheint, die Erkennung, Behandlung und Prognose solcher Krebserkrankungen zu optimieren (WHO, 2020). Dem statistischen Bundesamt zufolge starben in Deutschland im Jahr 2020 die meisten Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wozu unter anderem Herzinfarkte, Schlaganfälle, Bluthochdruck und andere ischämische Herzkrankheiten zählten. Die zweithäufigste Todesursache mit 23,5% aller verstorbenen Menschen in Deutschland im Jahr 2020 waren bösartige Neubildungen. Im Jahr 2017 waren es noch 227.595 Menschen, die aufgrund einer bösartigen Neubildung verstarben, während 2020 die Zahl der Toten auf 231.271 anstieg (Statistisches Bundesamt Destatis, 2022). Der Fokus aktueller Forschung sollte daher vermehrt auf die Früherkennung, Diagnostik und therapeutischen Möglichkeiten gelenkt werden, damit die Lebenserwartung und Lebensqualität von Patienten mit bösartigem Tumor optimiert werden können.

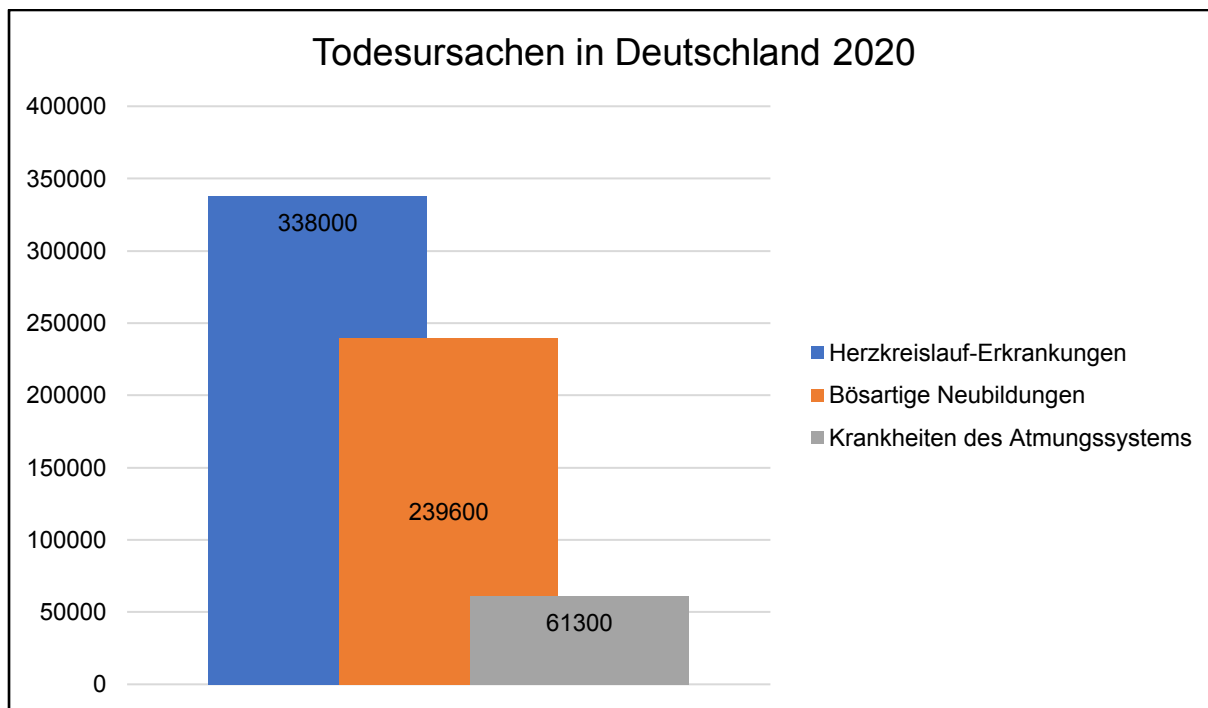


Abbildung 01: Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2020. Herz-Kreislauf-Erkrankungen führten mit 338 000 Todesfällen im Jahr 2020 am häufigsten zum Tod, gefolgt von bösartigen Neubildungen mit 239 600 Erkrankungen und Krankheiten des Atmungssystems mit 61 300 (Statistisches Bundesamt Destatis, 2022).

6.2. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCCs)

6.2.1. Epidemiologie

Diese Arbeit fokussiert sich auf Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs), bei denen am häufigsten das Schleimhautepithel der Mundhöhle, des Rachens oder des Kehlkopfes betroffen ist. Im Jahr 2018 waren HNSCCs die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit, mit 890.000 Neuerkrankungen und 450.000 Todesfällen (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Johnson et al., 2020). Es ist anzunehmen, dass die Inzidenz von HNSCCs in Zukunft weiter ansteigen wird, ein Zuwachs um 30% bis 2030 wird nach aktuellen Berechnungen erwartet (Global Cancer Observatory, 2018; (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Sung et al., 2021). Die Inzidenz stellt dabei die Anzahl der neu aufgetretenen Erkrankungen innerhalb einer Personengruppe binnen eines bestimmten Zeitraums dar.

Grundsätzlich werden weltweit regionale Unterschiede der Inzidenz und der Häufigkeit von Todesfällen durch Karzinome beobachtet. So wurde im Jahr 2018 geschätzt, dass fast die Hälfte der Krebsfälle und sogar mehr als 50% der Krebstodesfälle weltweit von Männern und

Frauen in Asien auftreten (Bray et al., 2018). Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, dass circa 60% der Weltbevölkerung in Asien lebt. In Europa leben lediglich 9% aller Menschen, jedoch werden auch hier beachtliche Fallzahlen geschätzt: weltweit werden 23,4% der Krebsfälle insgesamt und 20,3% der Krebstodesfälle in Europa beobachtet. Die weltweit zweitgeringste Krebsinzidenz mit 21% wird in Nord- und Südamerika beobachtet, während die dortige Krebssterblichkeit bei 14,4% liegt. Nur in Afrika gibt es geringere Karzinominzidenzen mit 5,8%, wobei die Krebssterblichkeit mit 7,3% sogar höher liegt, was auf eine unterschiedliche Verteilung von Karzinomlokalisationen und infolgedessen Prognosen zurückzuführen ist (Bray et al., 2018).

Das Auftreten verschiedener Karzinome ist weltweit stark unterschiedlich, was in Abbildung 02 durch eine Weltkarte mit regionalen Unterschieden der Karzinominzidenzen bei Männern (A) und Frauen (B) verdeutlicht wird. Während zum Beispiel das Prostatakarzinom in 105 Ländern, die am häufigsten diagnostizierte Krebsart ist, werden andere Karzinome hauptsächlich in einzelnen Regionen festgestellt. So sind beispielsweise Karzinome der Mundhöhle, welche zu den HNSCCs gehören, und Karzinome der Lippen vor allem in südasiatischen Ländern, wie Indien, Sri Lanka, Pakistan und Afghanistan vertreten. Papua-Neuguinea als zweitgrößte Insel der Erde im pazifischen Ozean, hat die weltweit höchste Inzidenzrate bei Mundhöhlenkarzinomen bei beiden Geschlechtern und in Indien und Sri Lanka sind Mundhöhlenkarzinome sogar die häufigste Krebstodesursache bei Männern. Bemerkenswert ist auch, dass beispielsweise das Leberkarzinom in geographisch heterogenen Regionen am häufigsten auftritt (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Sung et al., 2021). Bei Frauen ist das Mammakarzinom mit weitem Abstand in den meisten Ländern (154) das vorherrschende Karzinom.

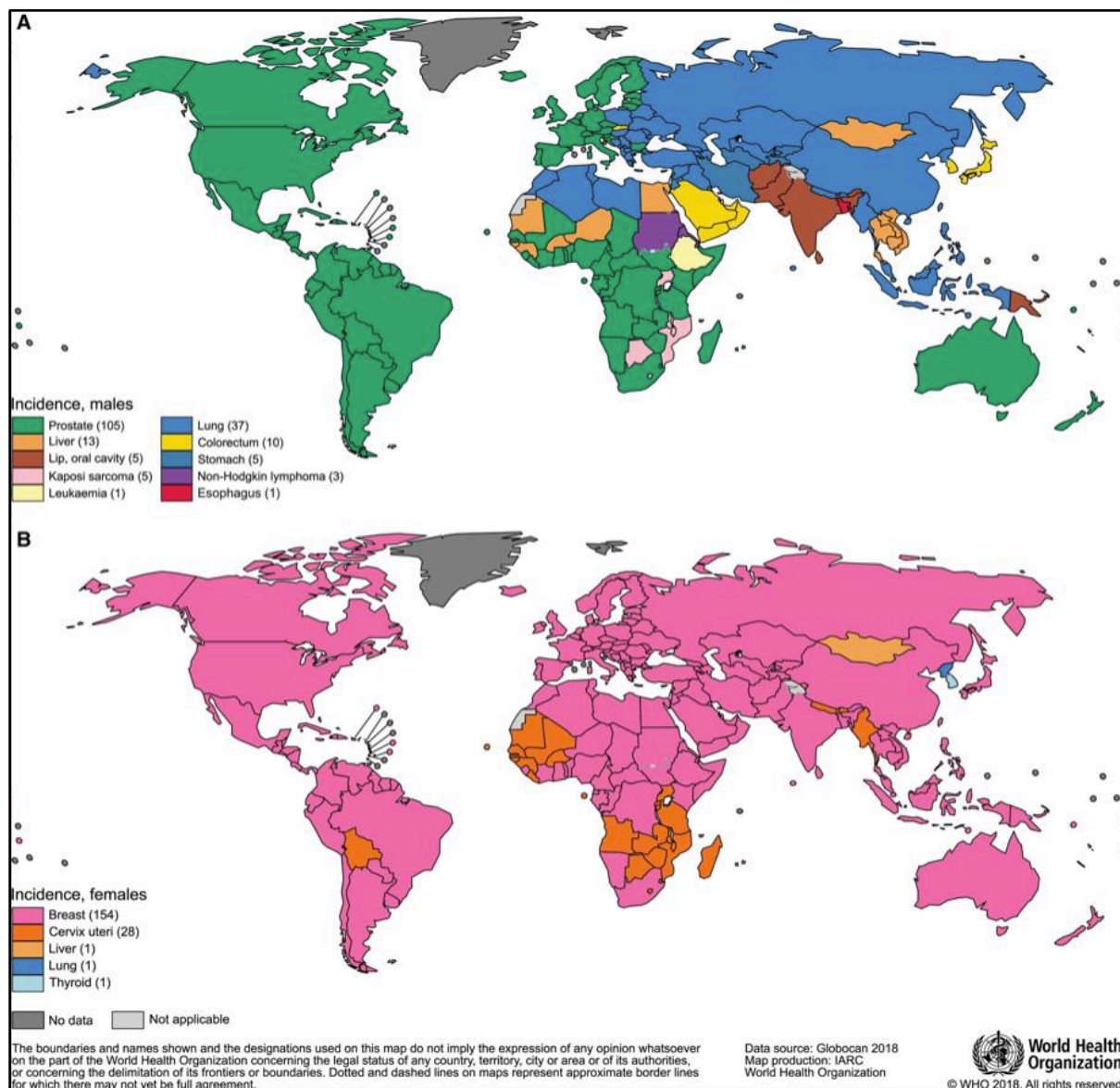


Abbildung 02: Die weltweit häufigsten Krebsinzidenzen im Jahr 2018 bei Männern (A) und Frauen (B). Bei Männern (A) kommt das Prostatakarzinom weltweit am häufigsten vor, gefolgt von Malignomen der Lunge und der Leber. Bei Frauen ist das Mammakarzinom mit weitem Abstand die häufigste Krebsdiagnose (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019).

6.2.2. Risikofaktoren

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die das Auftreten von HNSCCs begünstigen, wie zum Beispiel Tabakkonsum, Alkoholkonsum, die Exposition gegenüber Umweltschadstoffen, eine schlechte Mundhygiene und Infektionen mit viralen Erregern wie dem humanen Papillomvirus (HPV). Zu den geographisch am weitesten verbreiteten Risikofaktoren zählen der übermäßige Konsum von Tabak und Alkohol. Sollten beide Substanzen in höherem Maße gemeinsam konsumiert werden, erhöht sich das Risiko, an einem HNSCC zu erkranken, um den Faktor 35 (Blot et al., 1988). Vor allem in Ländern wie China und Indien,

in denen eine hohe Luftverschmutzung herrscht, stellen Luftschadstoffe und Feinstaub weitere Risikofaktoren für HNSCCs dar (Mishra & Meherotra, 2014; Wong et al., 2014). Ein weiterer Risikofaktor ist eine ungenügende Mundhygiene, was im Rahmen von zwei multizentrischen Fall-Kontroll-Studien nachgewiesen werden konnte (Guha et al., 2007). Unter anderem war das Fehlen einer Zahnbürste ein Merkmal, welches in diese Studien miteingeflossen ist (Guha et al., 2007).

Die Infektion mit bestimmten karzinogenen Typen des humanen Papillomvirus (HPV) stellt einen weiteren wichtigen Risikofaktor für die Entstehung eines HNSCCs dar. Es sind über 200 verschiedene Virustypen bekannt und sie werden größtenteils über einen direkten Kontakt von Mensch zu Mensch über infizierte Haut oder infizierte Schleimhäute übertragen. Je nach HPV-Typ kann die Infektion zu harmlosen Feigwarzen führen, die sich im Genitalbereich präsentieren können, bestimmte karzinogene HPV-Typen können aber auch ausschlaggebend für die Entstehung verschiedener Krebsarten sein. Dazu gehören Gebärmutterhalskrebs, Krebs der Vulva, der Vagina, des Anus, des Penis und auch Krebs im Mund- und Rachenbereich. Die HPV-Viren sind weltweit verbreitet und die meisten Menschen infizieren sich mindestens einmal in ihrem Leben mit HPV (Was ist HPV? Humane Papillomviren einfach erklärt., 2022). In den letzten 20 Jahren hat die Infektion mit karzinogenen HPV-Subtypen zu einem deutlichen Anstieg der HNSCC-Inzidenz geführt (Lechner et al., 2022). Grundsätzlich werden bei humanen Papillomviren aggressive von weniger aggressiven Untertypen unterschieden. HPV-16 ist bei >90% der virusassoziierten HNSCCs der primärverursachende HPV-Typ, wobei in einer großen Fall-Kontroll-Studie nachgewiesen werden konnte, dass auch andere Hochrisikotypen, wie HPV-18 und HPV-33 eine statistisch signifikante Korrelation mit dem Auftreten von Oropharynxkarzinomen, sowie HPV-52 mit Mundhöhlenkarzinomen aufweisen (Michaud et al., 2014).

Vor diesem Hintergrund ist zu beobachten, dass sich die Ätiologie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich in den letzten Jahren gewandelt hat. Während Noxen-induzierte HNSCCs eher seltener werden, nimmt die Inzidenz von HPV-induzierten HNSCCs deutlich zu. So wurde in internationalen Studien eine signifikant zunehmende Inzidenz von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren, insbesondere im Oropharynx, beschrieben (Wittekindt et al., 2019). In Ostänemark wurden in einer bevölkerungsbasierten konsekutiven Registerstudie alle Patienten untersucht, bei denen zwischen 2000 und 2017 ein oropharyngeales Plattenepithelkarzinom diagnostiziert wurde und es stellte sich heraus, dass es binnen dieser 18 Jahre zu einem dreifachen Anstieg der OPSCC-Inzidenz (oropharyngeal squamous cell carcinoma) kam (Zamani et al., 2020). In den USA nehmen

HPV⁺ oropharyngeale Plattenepithelkarzinome stetig zu, wie die epidemiologischen Bewertungen der nationalen HPV-Datenbanken bestätigen (Mahal et al., 2019).

Für die Entwicklung eines HPV⁻-HNSCCs stellt der Tabakkonsum den Hauptrisikofaktor dar und ein zusätzlicher übermäßiger Alkoholkonsum fördert synergetisch die Karzinogenese (Johnson et al., 2020; Talamini et al., 2002). Es wird vermutet, dass Alkohol als Lösungsmittel der Karzinogene dient und somit Epithelzellen diesen gegenüber exponierter sind (Johnson et al., 2020; Talamini et al., 2002). Oropharynxkarzinome, die wiederum überwiegend durch HPV verursacht werden, treten bei Männern im Vergleich zu Frauen dreibis fünfmal häufiger auf (Chaturvedi et al., 2011; D'Souza et al., 2007). Im Rahmen der United States National Health and Nutritional Examination Surveys (NHANES) wurde in einem Zeitraum von 2009 bis 2012 die Epidemiologie oraler onkogener HPV-Infektionen bei Männern und Frauen verglichen. Dabei fiel auf, dass Männer deutlich häufiger von einer onkogenen HPV-Infektion betroffen sind, was in positiver Korrelation mit mehreren verschiedenen Sexualpartnern im Laufe des Lebens steht (Chaturvedi et al., 2015). Als vorherrschende Risikofaktoren für ein HPV⁺-HNSCC gelten demnach das männliche Geschlecht und die höhere Anzahl an verschiedenen Sexualpartnern (Gillison et al., 2015). Der Grad der Differenzierung in der histopathologischen Analyse ist ebenfalls unterschiedlich je nach HPV-Tumorstatus. So sind HPV⁺-HNSCCs oftmals schlecht differenziert, was bedeutet, dass sie sich vom ursprünglichen Epithel stark unterscheiden, während HPV⁻-HNSCCs häufiger mäßig oder gut differenziert sind (Pai & Westra, 2009). Während das mittlere Alter der Patienten bei der Erstdiagnose eines HPV⁺-HNSCCs bei 53 Jahren liegt, wird ein HPV⁻-HNSCC erst in einem mittleren Alter von 66 Jahren diagnostiziert (S. H. Huang et al., 2015; Windon et al., 2018). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass es bei HPV⁺-Tumoren schon frühzeitig zu ausgedehnten Halslymphknotenmetastasen bei noch kleinem Primärtumor kommt, welche sich klinisch als schmerzlose Halsschwellung bemerkbar machen und der Patient sich dadurch früher in ärztliche Behandlung begibt (Johnson et al., 2020).

In einer prospektiven klinischen Studie von Fakhry et al. konnte gezeigt werden, dass der HPV-Status des Tumors auch bedeutsam für das therapeutische Ansprechen und das Überleben der Patienten ist. HPV⁺-HNSCC-Patienten haben höhere Ansprechraten für die Therapiemaßnahmen in Form von Induktionschemotherapien und Radiochemotherapien gezeigt. Basierend auf einer medianen Nachbeobachtungszeit von 39,1 Monaten zeigten die HPV⁺-HNSCC-Patienten zudem ein besseres Gesamtüberleben (2-Jahres-Gesamtüberleben = 95%) im Vergleich zu den HPV⁻-HNSCC-Patienten (2-Jahres-Gesamtüberleben = 62%) (Fakhry et al., 2008).

6.2.3. Symptome und Diagnostik

Die Symptome von HNSCCs sind abhängig von der Lokalisation des Tumors und von der jeweiligen Ätiologie. So können sich Plattenepithelkarzinome aufgrund einer HPV-Infektion anders präsentieren als durch Umweltkarzinogene hervorgerufene HNSCCs. Tumore in der Mundhöhle werden beispielsweise häufig schon früh diagnostiziert, da der Patient durch ein nicht abheilendes Geschwür im Mund bei alltäglichen und vor allem lebensnotwendigen Abläufen beeinträchtigt ist. Es kann zu Sprachstörungen und Schmerzen beim Kauen kommen, was den Patienten oftmals zeitnah in ärztliche Behandlung führt. Ähnlich ist es bei Tumoren des Larynx, da auch hier frühe und vom Patienten als störend empfundene Symptome wie Veränderungen der Stimme oder Heiserkeit oftmals zu einer frühen Diagnosestellung führen (Johnson et al., 2020). Anders ist es hingegen bei Tumoren im Oropharynx, die den weichen Gaumen, die Gaumenmandeln und den Zungengrund betreffen und bei Tumoren des Hypopharynx. Aufgrund der eher versteckten anatomischen Lage kommt es erst bei einem größeren Tumor zu Symptomen wie Schmerzen beim Essen und Schlucken, die nicht selten in die Ohren ausstrahlen, so dass hier die Diagnose häufig erst in einem bereits fortgeschrittenen Stadium gestellt wird (Johnson et al., 2020). Ungünstig im Kontext der Diagnostik von HNSCCs ist dabei, dass insbesondere die Patienten mit Noxen-induzierten Tumoren, die in Deutschland immer noch die Mehrzahl der HNSCC-Patienten darstellen, eher selten aus eigenem Antrieb ärztlichen Kontakt suchen und sich nur begrenzt proaktiv um die eigene Gesundheit kümmern. Dadurch wird der Zeitpunkt der Diagnosestellung eines HNSCCs oftmals beträchtlich verzögert.

Die Diagnose eines HNSCCs wird durch eine Biopsie des Tumors im Rahmen einer sogenannten Panendoskopie, (Mikrolaryngoskopie, Tracheobronchoskopie, Ösophagogastroskopie, Pharyngoskopie) mit histopathologisch sich routinemäßig anschließender Hämatoxylin- und Eosin-Färbung gestellt (Bray et al., 2018; Johnson et al., 2020; Pynnonen et al., 2017). Die rechtzeitige Diagnose eines HNSCCs ist für die Prognose von größter Bedeutung, da eine spät gestellte Diagnose oftmals mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und eingeschränkten Therapieoptionen einhergeht (Pynnonen et al., 2017).

6.2.4. Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten

Zu den aktuellen Therapiemöglichkeiten von HNSCCs zählen - je nach Krankheitsstadium - die chirurgische Resektion des Tumors gefolgt von einer adjuvanten Therapie als Strahlentherapie gegebenenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie (Johnson et al., 2020). So würde man sich im Fall eines Patienten mit kleinem Primärtumor ohne Befall der

Halslymphknoten oder mit Befall eines einzigen Halslymphknotens am wahrscheinlichsten für eine chirurgische Resektion oder eine alleinige Bestrahlung entscheiden und keine multimodale Therapie wählen. Die Heilungsraten liegen bei solch einem Behandlungskonzept aktuell bei ca. 80% (Johnson et al., 2020; Lee et al., 2018). Auch die Tumorlokalisation entscheidet maßgeblich mit über die Art der Behandlung. So werden Tumore in der Mundhöhle eher chirurgisch reseziert, während Tumore im Larynx und Pharynx tendenziell eher mit einer Bestrahlung therapiert werden (Johnson et al., 2020), wobei diese prinzipiell auch einer Tumorresektion mittels CO₂-Laser und/oder transoraler Roboter-gesteuerter Chirurgie (TORS) zugänglich sind (Forastiere et al., 2018; Weinstein et al., 2012). In lokal fortgeschrittenen Stadien mit einer größeren Tumormasse und mehreren befallenen Lymphknoten wird in der Regel entweder primär chirurgisch behandelt, gefolgt von einer postoperativen (adjuvanten) Radiatio oder Radiochemotherapie. Die adjuvante Therapie verringert das Risiko für Rezidive und verbessert die Überlebenschancen (Bernier et al., 2004; Cooper et al., 2004; Johnson et al., 2020). Retrospektive Studien zeigten, dass die primäre Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenen HNSCCs als alternative Behandlungsmethode ebenfalls fungieren kann und ähnlich gute Prognosen zeigt, verglichen mit einer primär chirurgischen Behandlung (Iyer et al., 2015; Tangthongkum et al., 2017).

Neben diesen seit vielen Jahrzehnten etablierten Therapieformen findet die Immuntherapie immer mehr ihren Weg in das Behandlungsspektrum von HNSCCs. Aktuell gibt es bereits zwei Immuncheckpoint-Inhibitoren, die von der Food and Drug Administration (FDA) und der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen wurden: Pembrolizumab und Nivolumab. Beide Wirkstoffe zählen zu den PD1-Antikörpern und können als second-line Therapie bei Patienten mit rezidivierten oder fernmetastasierten HNSCCs (R/M-HNSCCs) bei einem Progress während oder innerhalb von sechs Monaten nach einer Platin-basierten Therapie eingesetzt werden (Botticelli, Cirillo, et al., 2021; Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016; Ferris et al., 2019; Gillison et al., 2022; Gillison et al., 2018). Der Einsatz von Pembrolizumab in dieser Indikation ist dabei an eine hohe Expression von PD-L1 in den Tumorzellen gebunden (TPS>50%; tumor proportion score). Außerdem ist Pembrolizumab in der Erstlinientherapie bei R/M-HNSCC-Patienten als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie bei einem CPS>1 (combined PD-L1 positivity score) seit 2019 zugelassen (Burtness et al., 2019; Johnson et al., 2020; Rischin et al., 2022). Die Sicherheit, Wirkung und Verträglichkeit von Pembrolizumab bei Patienten mit einem rezidivierenden oder metastasierten HNSCC ist dabei dem ehemaligen Goldstandard einer Cetuximab basierten Chemo-Immuntherapie (syn. EXTREME-Schema) überlegen (Seiwert et al., 2016). Diese Ausführungen zeigen, dass die Immunonkologie in den zurückliegenden Jahren zunehmend auch in der Behandlung von HNSCCs an Bedeutung gewonnen und Eingang in

die klinische Praxis der HNO-Onkologie gefunden hat. Aktuell werden zahlreiche klinische Studien zu einem Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren in der Neoadjuvanz oder in verschiedenen Checkpoint-Inhibitor-Kombinationen durchgeführt, so dass deren Bedeutung in Zukunft wohl noch steigen wird. Dennoch zeigen viele Patienten kein oder nur ein passageres Ansprechen auf die verfügbaren PD1-Checkpoint-Inhibitoren, so dass weiterführende Untersuchungen zur Tumor-Immunzell-Interaktion erforderlich sind, um das therapeutische Spektrum zu erweitern und geeignete prädiktive Biomarker identifizieren zu können. Die hohen Therapiekosten einer Checkpoint-Inhibition unterstreichen die Wichtigkeit solcher wissenschaftlicher Arbeiten. In diesem Kontext beschäftigte sich die vorgestellte Studie mit der Relevanz der Stroma Seneszenz und der T-Zellerschöpfung für die Prognose von HNSCC-Patienten sowie einer potenziellen Relevanz für eine zielgerichtete Immuntherapie.

6.3. Tumormikromilieu

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Tumormikroumgebung auf die Tumorzellbiologie und den klinischen Verlauf von Kopf-Hals-Karzinomen anhand von fünf verschiedenen Markern der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) und Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) untersucht. Zudem ist es wichtig, weitere Einflussfaktoren, die den Krankheitsverlauf und die Prognose von HNSCC-Patienten verbessern können, zu untersuchen. Dazu gehört Vitamin D, welches in seiner Rolle als potenzieller Immunmodulator in dieser Arbeit genauer betrachtet wird.

In der Onkologie bezeichnet man die unmittelbare Umgebung eines malignen Tumors als Tumormikromilieu, welches oftmals sehr heterogen sein und sich von Tumor zu Tumor unterscheiden kann. Wie sich der Tumor entwickelt, hängt maßgeblich von seinem Mikromilieu ab und daher ist das Verständnis der ablaufenden Prozesse und Einflüsse essenziell, um weitere potenzielle Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Das Tumormikromilieu ist dabei sehr heterogen aufgebaut und besteht unter anderem aus kollagenem Bindegewebe, Immunzellen, Tumor-assoziierten Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßen. Um die Einflüsse des Tumormikromilieus auf die Tumorzellbiologie zu entschlüsseln, werden in dieser Arbeit verschiedene Marker der T-Zellerschöpfung und Stroma Seneszenz untersucht und überdies hinterfragt, wie sich ihr Einfluss auf den klinischen Verlauf von HNSCC-Patienten auswirkt. Zum Verständnis dieser immunologischen Prozesse ist die Kenntnis der Funktionsweise des humanen Immunsystems unabdingbar, weshalb dieses im folgenden Kapitel dargestellt wird.

6.3.1. Das Immunsystem

Der Mensch verfügt über verschiedene Mechanismen, welche angeboren oder erworben sein können, um sich vor Erkrankungen zu schützen. Die Haut und Schleimhäute stellen beispielsweise mechanische Barrieren dar, während die Magensäure als chemische Barriere fungiert, um pathogene Erreger davon abzuhalten, in den Organismus zu gelangen. Diese physikalischen und chemischen Mechanismen gehören zur angeborenen Immunantwort, welche bereits im Mutterleib oder postpartal vorhanden ist. Die Besonderheit des angeborenen Immunsystems besteht darin, dass keine Prägung oder Adaptation an spezifische Antigene stattfinden muss, sondern die Immunabwehr bereits ab dem ersten Kontakt mit einem Krankheitserreger vorliegt. Es gibt zudem zelluläre Mechanismen, die zur angeborenen Immunantwort gehören. Zu den Zellen des unspezifischen angeborenen Immunsystems zählen Granulozyten (neutrophil, eosinophil, basophil), antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen) und natürlichen Killerzellen. Mittels spezieller Rezeptoren (Pattern recognition receptors) können diese Zellen typische Strukturen von Pathogenen erkennen und diese anschließend direkt abtöten. Außerdem verfügt das angeborene Immunsystem über die Funktion, dass es den Zellen des erworbenen Immunsystems pathogene Erreger präsentieren kann und somit die Abwehr der spezifischen Immunantwort ergänzend unterstützt. Außerdem gibt es humorale Mechanismen, die ebenfalls eindringende Pathogene direkt abtöten oder die weitergehende spezifische Immunabwehr einleiten können. Dazu gehören Plasmaproteine, wie Akute-Phase-Proteine, proinflammatorische Zytokine und das Komplementsystem.

Wesentlicher Bestandteil des spezifischen Immunsystems, welches eine weitaus effektivere Immunantwort gewährleistet, die allerdings eine vorherige Aktivierung benötigt und daher eine längere Zeitspanne braucht, um die volle Effizienz zu erreichen, sind vor allem Lymphozyten. Mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren werden bestimmte Antigene der Pathogene erkannt, gegen welche die Lymphozyten gezielt vorgehen können. Man unterscheidet T-Lymphozyten, zu denen $CD4^+$ -T-Helferzellen und $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen zählen, von B-Lymphozyten, zu denen unter anderem Plasmazellen gehören. Beide Lymphozyten entstammen dem Knochenmark, der Ort ihrer Reifung ist allerdings unterschiedlich. T-Lymphozyten reifen im Thymus und mithilfe ihres T-Zellrezeptors können sie Antigene, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen des unspezifischen Immunsystems präsentiert werden, erkennen und darauf reagieren. $CD4^+$ -T-Helferzellen können nochmals unterteilt werden in TH1-Zellen, welche intrazelluläre Pathogene abwehren und TH2-Zellen, welche unter anderem bei der Abwehr von extrazellulären Parasiten helfen. Auf weitere spezifischere Funktionen von TH1- und TH2-Zellen soll hier nicht näher eingegangen werden. $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen wiederum können, nachdem sie mittels

eines MHC-I-Rezeptors präsentiertes körperfremdes Antigen erkannt haben, dieses gezielt abtöten. B-Lymphozyten entstehen und reifen im Knochenmark, wandern dann in sekundär lymphatische Organe und differenzieren dort nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, welche wiederum Antikörper produzieren. Zusätzlich gehören B-Lymphozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen, das heißt, dass B-Zellen mit Hilfe ihres MHC-II-Rezeptors erkannte Antigene präsentieren können. B- und T-Lymphozyten können eine Art immunologisches Gedächtnis ausbilden und somit den Organismus effektiv vor wiederkehrenden Erregern schützen. Das Immunsystem ist damit ein Zusammenspiel aus verschiedenen Mechanismen, die ab einem gewissen Punkt alle miteinander verknüpft sind und zusammenarbeiten, was dem Organismus einen größtmöglichen Schutz bietet (Herold, 2011; Hof et al., 2009; Königshoff & Brandenburger, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2015).

6.3.2. Stroma Seneszenz

Das Stroma stellt das stützende Bindegewebe eines Organs oder Gewebes dar und enthält Nerven, Blut- und Lymphgefäße sowie Stromazellen, wozu Fibrozyten und Fibroblasten gehören. Sie erfüllen die allgemeinen Aufgaben der Stütz- und Ernährungsfunktion, während Parenchymzellen spezifische Organfunktionen wahrnehmen (Deutzmann et al., 2008; Lüllmann-Rauch, 2006).

In den 1960er Jahren wurde von Hayflick und Moorhead die Seneszenz erstmals als ein permanenter Wachstumsstillstand beschrieben, welchen die Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in einer Kultur erreichen (1961). So stellten sie die Hypothese auf, dass Zellen einen internen Zählmechanismus besitzen, welcher die Zellteilung begrenzt, wodurch wiederum eine unkontrollierte zelluläre Transformation verhindert wird und die Zellen als Reaktion auf mitogene Stimuli nicht wieder in den Zellzyklus eintreten und resistent gegenüber dem Zelltod sind (Alspach et al., 2013; Calcinotto et al., 2019). Dieses biologische Phänomen des Wachstumsstillstands geht auf eine fortschreitende Verkürzung der Telomere zurück, die bei jeder Zellteilung stattfindet. Durch die Verkürzung der Telomere und somit die Einstellung des permanenten Wachstums und der Zellteilung, werden genomische Instabilität und als Folge auch DNA-Schäden zumeist verhindert (Courtois-Cox et al., 2008; HAYFLICK & MOORHEAD, 1961).

Diese Seneszenz tritt nun sowohl als physiologischer als auch als pathologischer Prozess in verschiedenen Geweben auf und ist zum Beispiel beteiligt an Gewebeumbauprozessen, Verletzungen, Alterung und auch an der Entstehung von Tumorerkrankungen. Förderlich ist die Seneszenz für den Gewebeumbau während der Embryogenese, damit es zu einer physiologischen Entwicklung des Embryos kommen kann (Davaapil et al., 2017).

Andererseits spielt die Seneszenz eine tragende Rolle im Alterungsprozess und führt zu einem Rückgang des Regenerationspotentials, welches wiederum bei Entzündungen oder der Tumorentstehung entscheidend ist (Calcinotto et al., 2019; Hernandez-Segura et al., 2018). Im Rahmen einer Tumorerkrankung kann durch eine Überexpression von bestimmten Onkogenen oder durch einen Verlust von Tumorsuppressorgenen onkogener Stress entstehen, welcher nachgewiesenermaßen zu einer Induktion der Seneszenz führt (Blasco et al., 1997; Counter et al., 1992). Die Seneszenz scheint also eine gewisse antiproliferative Wirkung zu haben und kann somit einen effektiven Antitumormechanismus darstellen. In aktuellen Studien werden die Schlüsselmerkmale und Biomarker der Seneszenz immer häufiger und intensiver untersucht, da die Induktion der Seneszenz in Krebszellen oder die Eliminierung seneszenten Zellen in alterndem Gewebe mögliche Weichen für neue Behandlungsstrategien darstellen können (Calcinotto & Alimonti, 2017; Calcinotto et al., 2019). Hinsichtlich der weiteren Forschung möglicher Biomarker, welche eine prognostische Aussicht und potenzielle Behandlungsstrategien für HNSCC-Patienten liefern können, werden in dieser Arbeit zwei dieser Seneszenz-Biomarker untersucht: IL-8 und MMP3.

IL-8 (Interleukin-8) gehört zur Familie der proinflammatorischen Chemokine und ist auch unter dem Namen CXCL8 (CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 8) bekannt. Ursprünglich besteht IL-8 aus 99 Aminosäuren, jedoch wird es nach der Expression durch eine posttranslationale Modifikation zur biologisch aktiven Form auf 72-77 Aminosäuren gekürzt. Produziert wird IL-8 von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Fibroblasten, Phagozyten und Mesenchymzellen als Reaktion auf einen entzündlichen Stimulus, wobei die Expression verschiedenen Einflussfaktoren unterliegt. Eine vermehrte Expression wird durch das Activator-Protein-1 herbeigeführt und gehemmt wird die Expression durch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemotherapeutika und Steroidhormone. Die Wirkung des posttranslational modifizierten IL-8 wird durch die Bindung an zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, erzielt. Die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1) und CXCR2 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2) durchlaufen anschließend eine Konformationsänderung, wodurch die spätere Signaltransduktion stattfinden kann. Letztendlich kommt es durch IL-8 zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, welche dann die Chemotaxis einleiten, was durch die Ausschüttung von Chemokinen dazu führt, dass Zellen des Immunsystems zum Ort der Entzündung wandern. Gleichzeitig können aktivierte neutrophile Granulozyten einen sogenannten oxidativen Burst ausüben. Dabei werden aggressiv-lytische Sauerstoffradikale freigesetzt, welche der Auflösung und Zerstörung von Erregerbestandteilen dienen, die zuvor die Phagozytose durchlaufen haben. Zudem wurde in Studien bereits beschrieben, dass IL-8 die Tumorprogression, Metastasierung und Invasion beeinflusst, wodurch die

Tumormikroumgebung von HNSCCs nachdrücklich verändert und die Karzinogenese positiv beeinflusst wird (Baggiolini et al., 1989; Keatings et al., 1996; Waugh & Wilson, 2008). Krebszellen sezernieren IL-8, wodurch aufgrund der Aktivierung von autokrinen Signalwegen die Überlebensdauer und Proliferation der Krebszellen begünstigt wird. Zudem werden durch IL-8 Endothelzellen des Tumorgefäßsystems aktiviert, was einerseits zu einer gesteigerten Angiogenese führt und andererseits die chemotaktische Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Tumorzelle erleichtert (Baggiolini et al., 1989; Keatings et al., 1996; Waugh & Wilson, 2008).

MMP3 (Matrix-Metalloproteinase 3) gehört als ein zinkabhängiges proteolytisches Enzym zur Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). T-Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen produzieren MMP3 und darüber hinaus wird MMP3 auch von Mesenchymzellen wie Fibroblasten und Chondrozyten exprimiert (Matrisian, 1992; Wang et al., 1999). Ursprünglich wurden MMPs in ihrer Funktion im Abbau und Umbau der Extrazellulärmatrix (EZM) erforscht (Gobin et al., 2019). In den letzten 40 Jahren konnten vielen Studien nachweisen, dass sowohl MMPs als auch weitere EZM-umbauende Endopeptidasen maßgeblich zu Veränderungen in der Tumormikroumgebung beitragen, die während der Krebsentstehung beobachtet werden können (Kessenbrock et al., 2010; Page-McCaw et al., 2007). Dazu zählen Einflüsse auf das Tumorwachstum, die Invasion und die Metastasierung während der Karzinogenese (Egeblad & Werb, 2002; Gialeli et al., 2011; Gobin et al., 2019; Vihinen & Kähäri, 2002). Physiologische Prozesse, wie Wundheilung, Organogenese, Gebärmutterinvolution und Fortpflanzung werden durch MMPs ebenfalls unterstützt, wobei sie auch auf pathologische Abläufe, wie Entzündungen sowie Gefäß- und Autoimmunerkrankungen Einfluss nehmen (Egeblad & Werb, 2002; Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007; Parks et al., 2004; Zhang et al., 2021). Weitere regulatorische Funktionen auf zellulärer Ebene führen dazu, dass MMPs an Abläufen der Apoptose, Immunität, Zellmigration und Angiogenese beteiligt sind (Jobin et al., 2017).

Zu den konkreten Funktionen von MMP3 gehören der Abbau von spezifischen Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie beispielsweise Fibronectin, Laminin, Gelatine Typ I, III, IV, V, sowie der Kollagene III, IV, X, IX und Knorpelproteoglykane. Die spezielle Rolle von MMP3 in der Karzinogenese liegt in der Invasion, Metastasierung und Proliferation, also im schnellen Wachstum und in der Vermehrung des Tumorgewebes (Huang et al., 2016; Spalding et al., 1989; H. Yang et al., 2016). Eine anhand von Daten des Cancer Genome Atlas (TCGA) durchgeführte Studie analysierte die Expression von 24 MMPs bei 15 verschiedenen Krebsarten, wobei auffiel, dass MMP3 bei sieben Krebsarten signifikant erhöht exprimiert war, was einen starken Zusammenhang zwischen MMP3 und der Tumorprogression unterstreichen kann (Gobin et al., 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es zu einer

Reorganisation der Extrazellulärmatrix aufgrund der erhöhten ektopischen Expression von MMP3 kommt, was eine maligne Transformation des Epithels begünstigt (Liang et al., 2021; Sternlicht et al., 1999).

6.3.3. T-Zellerschöpfung

T-Zellen können im Rahmen von chronischen Virus- oder Tumorerkrankungen durch eine anhaltende Antigenstimulation in einen Erschöpfungszustand übergehen, in dem sie nicht mehr ihre volle Funktionalität aufrechterhalten können. In ersten Studien wurde ein Erschöpfungszustand bei CD8⁺-T-Zellen im Rahmen einer chronischen Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) bei Mäusen beschrieben (Gallimore et al., 1998; Moskophidis et al., 1993; Zajac et al., 1998). Aufgrund der anhaltenden Antigenexposition präsentierten die Mäuse, die einer chronischen Infektion mit dem LCMV-Klon 13 ausgesetzt waren, dysfunktionale CD8⁺-T-Zellen, die als erschöpfte Zellen beschrieben wurden (Wherry et al., 2003; Wherry & Kurachi, 2015). Zunächst wurde dieses Erschöpfungsphänomen nur bei chronischen LCMV-Infektionen beobachtet, doch in neueren Studien wurde dies ebenfalls bei anderen chronischen Virusinfektionen beschrieben, wie beispielsweise bei dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Hepatitis-B-Virus (HBV), dem Hepatitis-C-Virus (HCV) und auch bei Autoimmunerkrankungen (Blank et al., 2019; Collier et al., 2021; Nagasaki & Togashi, 2022). Der Erschöpfungszustand wird in jüngster Zeit als ein Zustand der T-Zell-Dysfunktion kategorisiert, welcher auch bei Tumorerkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Baitsch et al., 2011; Budimir et al., 2022). Der Funktionsverlust erschöpfter T-Zellen macht sich durch einen fortschreitenden Verlust von Effektorfunktionen, eine hohe und fortdauernde Expression von inhibitorischen Immuncheckpoint-Rezeptoren, eine metabolische Dysregulation und eine verringerte Kapazität zur Zytokin-Sekretion bemerkbar (Blank et al., 2019; Nagasaki & Togashi, 2022). Den entscheidenden Einfluss auf die Erschöpfung haben die Dauer und der Grad der antigenen Stimulation (Blackburn et al., 2009; Fuller et al., 2004; Li et al., 2009; Mueller & Ahmed, 2009). Immuncheckpoint-Rezeptoren können die Signale in den Immunzellen entweder stimulieren oder inhibieren. Bei erschöpften T-Zellen werden die inhibierenden Immuncheckpoint-Rezeptoren hochreguliert, was zu einer zunehmenden Funktionsabnahme dieser T-Zellen führt und daher auch mit einer Tumorentwicklung assoziiert sein kann (Schreiber et al., 2011). Zu den inhibierenden Immuncheckpoint-Molekülen gehören unter anderem PD1, TIM 3 und LAG-3 (Beltra et al., 2020; Miller et al., 2019). Mit gezielten Antikörper-vermittelten Blockaden dieser inhibitorischen Immuncheckpoint-Rezeptoren, kann die zytotoxische Funktion CD8⁺-T-Zellen

wiederhergestellt und die Tumorlast somit besser kontrolliert werden (Barber et al., 2006; Hirano et al., 2005; Iwai et al., 2002). Zwei PD1-Antikörper (Pembrolizumab und Nivolumab) werden in den aktuellen Therapieleitlinien von HNSCCs in Form von Immuncheckpoint-Inhibitoren bereits angewendet (siehe Kapitel 6.2.4.). Darüber hinaus laufen einige klinische Studien zur Zulassung weiterer Immuncheckpoint-Inhibitoren mit verschiedenen therapeutischen Targets, darunter auch TIM 3 und LAG-3, sodass weitere potenzielle Antikörper klinische Anwendung in der Therapie von Karzinomen und im Speziellen in der HNSCC-Therapie finden können (He et al., 2018; Liu et al., 2016; Sauer et al., 2022; Schöffski et al., 2022).

Neben CD8⁺-T-Zellen können auch CD4⁺-T-Zellen von einem Erschöpfungszustand betroffen sein. Zu den CD4⁺-T-Zellen gehören unter anderem TH1-, TH2- und TH17-Zellen, die sowohl Helferfunktionen für andere Immunzellen als auch zytotoxische Funktionen haben. Chronische Infektionen mit dem LCM-Virus führten auch bei CD4⁺-T-Zellen zu einer höheren Expression von inhibierenden Immuncheckpoint-Molekülen (Aubert et al., 2011; Miggelbrink et al., 2021). Auch andere chronische Viruserkrankungen scheinen zu einer Hochregulierung dieser Immuncheckpoint-Rezeptoren zu führen, was in Summe daraufhin deuten kann, dass die Erschöpfung der CD4⁺-T-Zellen der Erschöpfung der CD8⁺-T-Zellen phänotypisch ähnelt (Crawford et al., 2014; Hwang et al., 2016). Im erschöpften Zustand können die CD4⁺-T-Helferzellen nicht mehr ihren Funktionen, wie zum Beispiel der unterstützenden Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen, der Aktivierung der bakteriellen Phagozytose oder der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nachkommen (Nagasaki & Togashi, 2022). Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass auch bei Tumorerkrankungen die T-Zellerschöpfung für den klinischen Verlauf, die Behandlungsmöglichkeiten und die Prognose eine wesentliche Rolle spielt. Eine Studie von Zhang et al. untersuchte beispielsweise die klinische Bedeutung der Tumormikroumgebung bei HNSCCs und fand heraus, dass eine positive Korrelation zwischen der Erschöpfung von CD8⁺-T-Zellen in der Tumormikroumgebung von HNSCCs und einer schlechteren Prognose dieser Patienten bestand (Burtneß et al., 2019; Zhang et al., 2022). Die mitunter für die T-Zellerschöpfung verantwortlichen inhibierenden Immuncheckpoint-Rezeptoren stellen somit interessante Zielstrukturen zukünftiger immunonkologischer Therapieansätze dar. In dieser Arbeit wurden drei Marker der T-Zellerschöpfung untersucht, um neben den bereits zugelassenen Antikörpern weitere inhibitorische Immuncheckpoints ausfindig zu machen, die bei einer Antikörper-basierter zielgerichteter Therapie das Potential haben können die T-Zellerschöpfung zu überwinden: PD1, TIM 3 und LAG-3.

PD1 (programmed cell death protein 1) ist ein Transmembranprotein und wird sowohl von T-Zellen als auch von Pro-B-Zellen exprimiert. Es gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus 268 Aminosäuren, die sich in drei Abschnitte einteilen lassen. Es gibt eine extrazelluläre IgV-Domäne, welche zwei verschiedene Liganden (PD-L1 und PD-L2) binden kann, sowie eine Transmembranregion und einen intrazellulären Schwanz. PD1 ist durch die negative Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung maßgeblich am Ablauf einer Immunantwort beteiligt und stabilisiert als Immuncheckpoint das Gleichgewicht zwischen der gewünschten Immunität und unerwünschten autoimmunologischen Pathologien (Sharpe & Pauken, 2018). Durch die Präsentation von Antigenen kommt es zur Aktivierung der T-Zellen, welche mehreren Regulierungsmechanismen unterliegt. Die Antigen-vermittelte T-Zell-Aktivierung umfasst eine Peptid-MHC-Bindung des T-Zell-Rezeptors, sowie positive kostimulatorische Signale und Interaktionen zwischen CD28 auf T-Zellen und CD80 auf Antigen-präsentierenden Zellen. PD1 wird bei der T-Zell-Aktivierung exprimiert und fungiert hierbei als negativer Regulator, indem es seine Liganden PD-L1 und PD-L2 bindet und somit den positiven Signalen durch den T-Zell-Rezeptor und CD28 entgegenwirkt. Des Weiteren wirkt das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen (CTLA4) ebenfalls als negativer Regulator. PD1 und CTLA4 fungieren demnach als Immuncheckpoints und sorgen für eine Unterbrechung der adaptiven Immunantwort, die von den Effektor-T-Zellen zunächst kontrolliert überwunden werden muss, damit diese ihre volle Wirkung entfalten können (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000; Greenwald et al., 2005; Latchman et al., 2001; Tseng et al., 2001). Verschiedene Studien unterstützen die Annahme, dass PD1 als relevanter Regulator der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Immunsystem dient. Beispielsweise entwickelten Mäuse mit genetischem Mangel an *Pcd1* (codiert für PD1) eine verfrühte Autoimmunität (Lucas et al., 2008; Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001; Wang et al., 2005), während chronische Infektionen und Krebserkrankungen wiederum zu einer hohen und andauernden Expression von PD1 und seinen Liganden führten, was aufgrund der Blockierung des PD1-Signalwegs zu einer stärkeren T-Zell-Funktion und gleichzeitig verringerten Virus- und Tumorlast führte (Barber et al., 2006; Curiel et al., 2003; Hirano et al., 2005; Iwai et al., 2002; Iwai et al., 2005; Pauken & Wherry, 2015; Strome et al., 2003).

TIM 3 (T-cell immunglobulin and mucin-domaining containing-3, TIM 3 oder hepatitis A virus cellular receptor 2, HAVCR2) ist ein Oberflächenmolekül auf T-Zellen und gehört der TIM-Familie als ein immunregulatorisches Protein an. TIM 3 kann in drei Abschnitte unterteilt werden, wozu ein extrazellulärer Abschnitt mit einer distalen variablen Immunglobulin-Domäne (IgV) und einer proximalen glykosylierten Mucin-Domäne, sowie eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit einem zytoplasmatischen Schwanz gehören (Monney et al., 2002; Wolf et al., 2020). Viele Immunzellen exprimieren

TIM 3, darunter CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, T_{reg}-Zellen, myeloische Zellen, sowie natürliche Killerzellen und Mastzellen (Anderson et al., 2007; Gao et al., 2012; Monney et al., 2002; Ndhlovu et al., 2012; Phong et al., 2015). Liganden, wozu Galectin 9, Phosphatidylserin, CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) und HMGB1 (High Mobility Group Protein 1) gehören, können an verschiedene Regionen der extrazellulären IgV-Domäne des TIM 3 binden. Durch die Bindung von Galectin 9 an TIM 3 wird aufgrund eines intrazellulären Calciumeinstroms der Zelltod von TIM 3⁺-T-Zellen induziert (Zhu et al., 2005). Verschiedene Studien zeigen, dass Immunreaktionen durch eine Interaktion zwischen TIM 3 und Galectin 9 über verschiedene Mechanismen herabgesetzt werden (Dardalhon et al., 2010; Gonçalves Silva et al., 2017; Ju et al., 2014; Kang et al., 2015; Kikushige et al., 2015). Der Ligand HMGB1 kann zum Beispiel von Tumorzellen sezerniert werden und anschließend durch die Bindung an TIM 3⁺ myeloische Zellen in der Tumormikroumgebung die Aktivierung des angeborenen Immunsystems beeinträchtigen (Curtin et al., 2009; Wolf et al., 2020). CEACAM1 ist der zuletzt entdeckte Ligand für TIM 3 und beeinflusst die Regulierung einer antiviralen Reaktion (Gray-Owen & Blumberg, 2006; Y. H. Huang et al., 2015; Khairnar et al., 2018). Zudem könnte die TIM 3-CEACAM1-Interaktion zunehmend als Zielstruktur für Immuntherapien bei Krebserkrankungen wahrgenommen werden, da sich bereits in verschiedenen Mausmodellen *in-vivo* die Therapie von gegen TIM 3 gerichteten Antikörpern als wirksam erwiesen hat (Sabatos-Peyton et al., 2018; Wiener et al., 2007). TIM 3 fungiert außerdem als Marker der T-Zellerschöpfung bei viralen oder tumorbedingten Erkrankungen und markiert darüber hinaus im Rahmen eines Tumorgeschehens die tumorinfiltrierenden CD8⁺-PD1⁺-T-Zellen (Fourcade et al., 2014; Jin et al., 2010; Sakuishi et al., 2010). In Studien wurde bereits gezeigt, dass das Tumorwachstum durch eine Antikörper-vermittelte Blockade von TIM 3 und PD1 gehemmt werden und die tumorspezifische Antwort der CD8⁺-T-Zellen verbessert werden kann (Fourcade et al., 2010; Fourcade et al., 2014; Sakuishi et al., 2010). In vielen Tumoren sind TIM 3⁺-T_{reg}-Zellen die vorherrschende T_{reg}-Zellpopulation und korrelieren mit der Tumorprogression sowie dem Schweregrad der Erkrankung (Gao et al., 2012; Sakuishi et al., 2013; Yan et al., 2013). So konnte beispielsweise die Anzahl der TIM 3⁺-T_{reg}-Zellen durch eine TIM 3-Blockade in einem Modell mit Mäusen mit HNSCCs verringert werden, wodurch auch das Tumorwachstum gehemmt wurde (J. F. Liu et al., 2018).

LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) ist ebenfalls ein Transmembranprotein und besteht aus 489 Aminosäuren. Es gehört zu der Gruppe der Ig-Superfamilie und hat vier IgG-Schleifen (Goldberg & Drake, 2011). Es wird von aktivierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen, B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert und dient als Rezeptor von MHC-Klasse-II-Molekülen und Fibrinogen-like-Protein-1 (Huard et al., 1994; Kisielow et al.,

2005; Triebel et al., 1990; Workman et al., 2009). Die Interaktion zwischen LAG-3 und seinem Hauptliganden, dem MHC-Klasse-II-Molekül, wird als ursächlich dafür angenommen, dass LAG-3 die Funktion dendritischer Zellen modulierend beeinflusst (Andreae et al., 2002). Zudem spielt LAG-3 eine Rolle in der Erschöpfung von CD8⁺-T-Zellen, in Form eines negativen Regulators, was in jüngsten präklinischen Studien beschrieben wurde (Blackburn et al., 2009). Frühere Studien zeigten, dass es bei menschlichen CD4⁺-T-Zellklonen zu einer anhaltenden Proliferation, einhergehend mit einer verstärkten Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-2, IL-4 und Interferon- γ kommt, wenn LAG-3 *in-vitro* mittels eines monoklonalen Antikörpers blockiert wird (Huard et al., 1995). Zunächst konnten diese Ergebnisse nicht auf CD8⁺-T-Zellen übertragen werden, doch nach vielen weiteren Studien konnte schließlich definitiv bestätigt werden, dass sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen durch LAG-3 negativ reguliert werden (Maçon-Lemaître & Triebel, 2005; Workman et al., 2002). Durch eine Assoziation mit dem T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex hemmt LAG-3 die T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion (Hannier et al., 1998), allerdings konnten die genauen Mechanismen der intrazellulären negativen Signaltransduktion noch nicht abschließend geklärt werden (Iouzalén et al., 2001; Maeda et al., 2019; Workman et al., 2002; Workman & Vignali, 2003). Als Hinweis für einen Erschöpfungszustand der T-Zellen wird eine erhöhte LAG-3 Expression gesehen, welche mit einer gestörten Immunhomöostase einhergeht und bereits mit verschiedenen Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebracht werden konnte (Chocarro et al., 2022). Interessant ist, dass eine gleichzeitige erhöhte Expression von LAG-3 und PD1 in T-Zellen für eine noch stärkere Erschöpfung und damit einhergehende Dysfunktionalität der T-Zellen spricht. Dies wird bei Krebspatienten mit einer Resistenz gegenüber Anti-PD1-Immuntherapien in Zusammenhang gebracht, wobei eine gezielte Blockade von LAG-3 und PD1 durchaus die Antitumoraktivität von T-Zellen wieder steigern könnte (Chocarro de Erauso et al., 2020; Datar et al., 2019; Jing et al., 2015; Lichtenegger et al., 2018; Lino et al., 2018; Matsuzaki et al., 2010; Wang et al., 2018; Zuazo, Arasanz, Bocanegra, Chocarro, et al., 2020; Zuazo, Arasanz, Bocanegra, Fernandez, et al., 2020; Zuazo et al., 2019). Bei einer Blockade von LAG-3 mittels eines monoklonalen Antikörpers kann die T-Zellfunktion in verschiedenen Modellen wiederhergestellt beziehungsweise gesteigert werden, was einen interessanten Ansatz für eine mögliche Immuntherapie für Krebspatienten darstellt (Goldberg & Drake, 2011).

LAG-3 sollte, genau wie die beiden anderen untersuchten Marker der T-Zellerschöpfung (PD1 und TIM 3) als therapeutische Zielstruktur weiter erforscht werden, um ergänzende Therapiestrategien zur Behandlung von HNSCCs voranzutreiben.

6.4. Vitamin D

In den vorherigen Kapiteln wurde die Epidemiologie von Krebserkrankungen erläutert, an denen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs einen großen Anteil haben. Zwar gibt es schon erste innovative Behandlungsstrategien in Form von Immunmodulatoren, jedoch sind die Prognosen von HNSCC-Patienten oftmals noch schlecht. Umso wichtiger wird die Suche nach neuen Einflussfaktoren, die den Krankheitsverlauf und die Prognose von HNSCC-Patienten verbessern können. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Marker der Stroma Seneszenz und der T-Zellerschöpfung, darüber hinaus wurde der Einfluss von Vitamin D als potenzieller Immunmodulator auf die Tumormikroumgebung von HNSCCs ebenfalls untersucht. Im Folgenden wird daher die Physiologie von Vitamin D genauer erläutert.

6.4.1. Vitamin D-Metabolismus

Das Vitamin D (Calciferol) gehört zusammen mit den Vitaminen A, E und K zu der Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Diese Vitamine werden nicht zur Energiegewinnung abgebaut, sondern erfüllen spezielle Aufgaben. Sie stellen essenzielle Nahrungsbestandteile dar, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, wobei Vitamin D hier eine Sonderstellung innehat, da es vom Organismus auch selbst synthetisiert werden kann. Es gibt sowohl verschiedene inaktive Vorstufen als auch zwei aktive Formen des Vitamin D, einschließlich das aktivierte Vitamin D₂ (1,25-Dihydroxyergocalciferol) und das aktivierte Vitamin D₃ (Calcitriol, 1,25-Dihydroxycholecalciferol), welches hauptverantwortlich für die biologischen Wirkungen von Vitamin D im menschlichen Körper ist. Vitamin D₂ kommt hauptsächlich in Pflanzen vor und kann somit über pflanzliche Lebensmittel dem Körper zugeführt werden, während Vitamin D₃ in tierischen Nahrungsmitteln, wie beispielsweise fetthaltigem Fisch, Pilzen oder Eiern enthalten ist. Die Tatsache, dass nur wenige Lebensmittel Vitamin D₃ enthalten, macht die vollständige körpereigene Synthese umso wichtiger und stellt gleichzeitig eine Besonderheit dar, weil dies das einzige Vitamin ist, welches der Organismus vollständig selbst herstellen kann. Mit circa 80-90% gewährleistet die körpereigene Synthese den größten Anteil der Vitamin-D₃-Gewinnung (Holick, 2007). Bei der körpereigenen Synthese wird aus Cholesterin in mehreren Schritten in Leber, Haut und Nieren, Vitamin D₃ (Calcitriol) hergestellt. Die einzelnen Schritte werden in Tabelle 01 zur Vereinfachung dargestellt.

Leber	Cholesterin → 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D3)
Haut	Speicherung von 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D3) Spaltung von 7-Dehydrocholesterin durch UV-Strahlen → Cholecalciferol
Leber	Hydroxylierung von Cholecalciferol → 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol)
Nieren	Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol → 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol)

Tabelle 01: Ablauf der körpereigenen Vitamin D-Synthese.

Der limitierende Faktor für die körpereigene Vitamin D-Synthese ist dabei die Sonnenlichtexposition (Holick, 2007). Die für die Phase der Synthese in der Haut benötigten UV-Strahlen kommen in Regionen unterhalb des 35. Breitengrads nicht ganzjährig vor, was die körpereigene Vitamin-D₃-Bildung somit von den Jahreszeiten und vom Wetter abhängig macht (Engelsen et al., 2005; Tsiaras & Weinstock, 2011). Da Deutschland zwischen dem 47. und 55. Breitengrad liegt und in diesen höhergelegenen Breitengraden die Dauer und die Intensität der UV-Strahlen abnehmen, können in Deutschland lebende Menschen nur im ungefähren Zeitraum zwischen März und Oktober körpereigenes Vitamin D in ausreichendem Umfang synthetisieren (Rabenberg et al., 2016). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt daher 20µg Vitamin D jeden Tag über die Nahrung aufzunehmen, jedoch liegt die tatsächliche durchschnittliche Vitamin D Aufnahme unterhalb dieser Empfehlung (Hintzpeter et al., 2008; Society, 2012).

6.4.2. Vitamin D-Status in Deutschland

Durch die Messung von 25-Hydroxy-Vitamin-D (25-OH-Vitamin-D) im Serum wird der Vitamin D-Versorgungsstatus bei Menschen bestimmt. Die Werte können allerdings binnen eines Jahres um den Faktor zwei schwanken (Hyppönen & Power, 2007). Es herrscht Uneinigkeit darüber, ab wann ein Serumwert als angemessen und ausreichend gilt. Die European Food Safety Authority (EFSA) und die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) halten eine Konzentration des 25-Hydroxy-Vitamin-D ≥ 50 nmol/l als angemessen, während die Endocrine Society höhere Werte (>75 nmol/l) als untere Grenze annimmt. Vom Robert-Koch-Institut wurden zwischen 2008-2011 Daten über den Vitamin D-Status von $n = 6995$ erwachsenen Patienten gesammelt und in der Deutschen Gesundheits-Umfrage für Erwachsene (DEGS1) zusammengetragen. Dabei lag der durchschnittliche Serum-25(OH)Vitamin-D-Spiegel bei 45,6 nmol/l. 61,6% der Teilnehmer hatten Serum-25(OH)D-Werte < 50 nmol/l, während sogar 30,2% der Teilnehmer Serumwerte < 30 nmol/l aufwiesen. Im Sommer sinkt dieser Wert auf weniger als 50%, während im Winter die Personenzahl mit Vitamin D-Mangel auf circa 80% steigt (Rabenberg et al., 2015).

6.4.3. Folgen des Vitamin D-Mangels

Vitamin D hat Einfluss auf den Calcium- und Phosphatstoffwechsel und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Mineralisierung sowie den Knochenaufbau und Knochenumbau. Es fördert die Calcium- und Phosphatresorption im Darm und in der Niere und steigert somit den Calcium- und Phosphatspiegel im Blut (Holick, 2004a, 2007).

Ein Vitamin D-Mangel kann zu den Krankheitsbildern Rachitis (Kindesalter) und Osteomalazie (Erwachsene) führen. Aufgrund einer mangelnden Knochenmineralisierung kommt es zu schmerzhaften Knochenerweichungen mit Deformierungen und pathologischen Frakturen als mögliche Folgen. Ursachen eines Vitamin D-Mangels können Mangelernährung, Resorptionsstörungen im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Hydroxylierungsstörungen aufgrund von Leber- oder Niereninsuffizienzen oder wie oben beschrieben, eine geringe UV-Strahlung sein (Kerbl et al., 2007; Speer et al., 2009; AWMF-Leitlinienregister, o. D.). Die Therapie besteht zusätzlich zur Behandlung der Grunderkrankung aus einer Substitution von Vitamin D und Calcium. Ein Vitamin D-Mangel wird aber auch mit einem höheren Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes oder multiple Sklerose sowie Lungen-, Brust- und Darmkrebs in Verbindung gebracht (Bahrami et al., 2020; Buleu et al., 2019; Holick, 2004b, 2007; Jenab et al., 2010; Mozos & Marginean, 2015). Der Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem wurde in den zurückliegenden Jahren intensiv untersucht und detailliert beschrieben, zahlreiche Fragen hinsichtlich der genauen Zusammenhänge verbleiben jedoch noch offen.

6.4.4. Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

Der Einfluss von Vitamin D auf die angeborene und adaptive Immunantwort wird mit der Entdeckung begründet, dass nahezu alle Immunzellen einen Vitamin D-Rezeptor exprimieren (Provvedini et al., 1983; Veldman et al., 2000). Zu den Immunzellen, welche den Vitamin D-Rezeptor exprimieren, gehören dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen. Zudem exprimieren sie die 1α -Hydroxylase (CYP27B1), welche als Enzym die Aktivierung von Vitamin D₂ zu Calcitriol steuert (Ao et al., 2021; Hart et al., 2011). Vitamin D spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Abwehr von Infektionskrankheiten, auch gibt es Zusammenhänge mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen. Zudem macht man sich die krebshemmende Wirkung von Vitamin D zur Behandlung von Tumorerkrankungen zu Nutze (Jeon et al., 2018). Die

Wechselwirkungen zwischen Vitamin D und Immunzellen sind sehr komplex, da die Expression des Vitamin D-Rezeptors je nach Aktivierungsstatus der Immunzellen unterschiedlich gesteuert wird. Aktivierte T-Zellen steigern zum Beispiel ihre Vitamin D-Rezeptor-Expression, während Monozyten weniger Vitamin D-Rezeptoren exprimieren, sobald sie sich in Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren (Baeke, Korf, et al., 2010; Hewison et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich die Tumormikroumgebung von HNSCC-Patienten untersucht, wobei Vitamin D als potenzieller Immunmodulator ebenfalls genauer analysiert wird, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Vitamin D und der Aktivität von Immunzellen zu identifizieren. Daher werden im Folgenden kurz die Einflüsse von Vitamin D auf T- und B-Lymphozyten erläutert.

Über einen indirekten Weg beeinflusst Calcitriol die T-Lymphozyten, indem es die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen und costimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) herunterreguliert und somit die Antigenpräsentation verringert, welche notwendig ist für den Ablauf der adaptiven Immunabwehr durch T-Lymphozyten (Xu et al., 1993). Calcitriol hat eine ähnliche Wirkung auf dendritische Zellen, bei denen auch die Antigenpräsentation verringert wird, sowie die Produktion von IL-12 und IL-23 gehemmt und die Freisetzung von IL-10 und MIP-3 α (Makrophage inflammatory protein 3 α) gesteigert wird (Baeke, Takiishi, et al., 2010). Durch die indirekte Wirkung des Calcitriols und die daraus resultierende verminderte Antigenpräsentation, kommt es zu einer verminderten Proliferation autoreaktiver T-Lymphozyten mit gleichzeitiger Induktion der Apoptose und einem Anstieg der T_{regs} (Baeke et al., 2007; van Halteren et al., 2004). Die direkte Wirkung von Calcitriol auf T-Lymphozyten ist komplexer, da die Menge der Expression von Vitamin D-Rezeptoren auf T-Lymphozyten von deren Aktivierungszustand abhängt (Baeke, Korf, et al., 2010; Mahon et al., 2003). Calcitriol hemmt die Produktion einiger Zytokine von T-Zellen. Bei TH1-Zellen wird die Produktion von IL-2 und Interferon- γ , bei TH17-Zellen die Produktion von IL-17 und IL-21 und bei TH9-Zellen wird die Produktion von IL-9 gehemmt (Baeke, Gysemans, et al., 2010; Cantorna et al., 2015; Jeffery et al., 2009; Takiishi et al., 2013).

Calcitriol hat ebenfalls einen Einfluss auf B-Lymphozyten, da diese gleichermaßen den Vitamin D-Rezeptor und die 1 α -Hydroxylase exprimieren (Vanherwegen et al., 2017). In jüngeren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Calcitriol bei aktivierten B-Lymphozyten die Apoptose auslöst und ebenso die Differenzierung zu Plasmazellen verhindert (Chen et al., 2007; Geldmeyer-Hilt et al., 2011; Lemire et al., 1984). Eine weitere regulatorische Wirkung des Calcitriols wird beschrieben, indem es die Produktion von IL-10 durch B-Lymphozyten steigert (Heine et al., 2008).

Der kurze Einblick in verschiedene Wechselwirkungen zwischen Vitamin D und Immunzellen zeigt, dass Vitamin D auf das angeborene und erworbene Immunsystem modulierend wirkt und insgesamt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase spielt.

6.5. Eigene Fragestellung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region stellen aufgrund ihres häufigen weltweiten Auftretens und den noch immer limitierten Überlebenschancen trotz hohem therapeutischem Aufwand einen bedeutsamen Forschungsschwerpunkt dar. Zusätzlich zu den herkömmlichen Therapieoptionen in Form von Operationen, Chemo- und Strahlentherapie, spielt die Immuntherapie eine immer größer werdende Rolle, sodass auf Grundlage der KEYNOTE-040-Studie, der KEYNOTE-048-Studie und der CheckMate-141-Studie, bereits zwei PD1-Antikörper in Form von Immuncheckpoint-Inhibitoren (Pembrolizumab, Nivolumab) in den aktuellen Therapieleitlinien von HNSCCs Anwendung finden (Burtneß et al., 2019; Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016). Leider sind auch hier die therapeutischen Ansprechraten noch gering, was den Fokus zukünftiger wissenschaftlicher Studien zu weiteren therapeutischen Zielstrukturen lenken kann. Die Tumormikroumgebung von HNSCCs ist aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Immunzellen, Tumorzellen und weiteren Molekülen sehr komplex und spielt eine maßgebliche Rolle in der Tumorgenese von HNSCCs. Die Entschlüsselung dieser Wechselwirkungen könnte neue therapeutische Zielstrukturen aufdecken, sodass weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren identifiziert werden können. Sowohl die T-Zellerschöpfung als auch die Stroma Seneszenz beteiligen sich stark an der Tumorgenese von HNSCCs. Aufgrund einer anhaltenden Antigenexposition kommt es zu einem Erschöpfungszustand von T-Zellen, welcher ebenfalls bei HNSCCs beobachtet werden konnte. Daraus resultiert eine verminderte Effektor-T-Zell-Funktion, was zu einer schwächeren Tumorabwehr durch das Immunsystem und letztlich zu einer schlechteren Prognose von HNSCC-Patienten führen kann (Blank et al., 2019; Nagasaki & Togashi, 2022). Die Erkenntnis, dass erschöpfte T-Zellen inhibierende Rezeptoren, wie PD1, TIM 3 und LAG-3 stärker exprimieren (Schreiber et al., 2011), führt zu der potenziellen therapeutischen Möglichkeit, gezielte Blockaden in Form von Immuncheckpoint-Inhibitoren einzusetzen. Die Stroma Seneszenz als ein Zustand des permanenten Wachstumsstillstands spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Eine Induktion der Seneszenz in Tumorzellen oder aber die Eliminierung seneszenten Zellen in alterndem Gewebe stellen interessante neue Behandlungsstrategien dar, welche in aktuellen Studien derzeit erforscht werden (Calcinotto & Alimonti, 2017; Calcinotto et al., 2019). In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit fünf Marker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3)

und Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) an FFPE-Gewebeproben eines Kollektivs von 116 HNSCC-Patienten immunhistochemisch untersucht, semiquantitativ ausgewertet und mit klinisch-pathologischen Daten der Patienten korreliert.

Ziel der Studie war es, tumorbiologische Zusammenhänge im Tumormikromilieu weiter zu entschlüsseln, um neue potenzielle Immuncheckpoints zu identifizieren, die als vielversprechende therapeutische Zielstrukturen biologische Phänomene wie die T-Zellerschöpfung und Stroma Seneszenz überwinden können. Darüber hinaus wurde die prognostische Relevanz der Biomarker getestet, um überdies weitere Surrogatmarker für HNSCCs ausfindig zu machen, damit Entscheidungen und Fragestellungen zum therapeutischen Vorgehen sowie zur Prognose im klinischen Alltag erleichtert werden können.

7. Material und Methoden

7.1. Material und Herstellernachweis

7.1.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

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

Tabelle 02: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Hersteller/Herkunft.

7.1.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/ Herkunft
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Art. A9418
Ethanol, 100 %	Merck, Art. 8187601000
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Art. MHS32-1L
Trizma® Base	Sigma, Art. 061M5400V
Tween®20	Merck, Darmstadt, Art. 817072
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Art. 09208831

Tabelle 03: Verwendete Chemikalien mit Hersteller/Herkunft.

7.1.3. Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
0,1 M Citronensäure-Lösung	21,01 g Citronensäure Monohydrat 1000 ml Aqua dest.
0,1 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat-Lösung	29,41 g Tri-Natriumcitrat-dihydrat Lösung 1000 ml Aqua dest.
0,5 M EDTA-Lösung; pH 8,0	93,06 g EDTA 300 ml Aqua dest.
1 % BSA in PBS; pH 7,2	195 ml PBS 2 g BSA
1 M Tris-Lösung	12,11 g Tris (-Base) 100 ml Aqua dest.
3 % BSA in PBS; pH 7,2	190 ml PBS 6 g BSA
5 % BSA in PBS; pH 7,2	190 ml PBS 10 g BSA
Citrat Retrieval-Puffer; pH 6,0	4,5 ml 0,1 M Citronensäure-Lösung 20,5 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat Lösung 225 ml Aqua dest.
PBS Waschpuffer; pH 7,4	Thermo Fisher Scientific
Substrat-Chromogen-Lösung	750 µl AP-Puffer (10ml AP-Substrat-Puffer und 1 Tropfen Levamisol) 30 µl Chromogen 1 30 µl Chromogen 2 30 µl Chromogen 3
Tris-EDTA Retrieval-Puffer; pH 9,0	3,0 ml 1 M Tris-Lösung 600 µl 0,5 M EDTA-Lösung 296,4 ml Aqua dest.

Tabelle 04: Verwendete Lösungen und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung.

7.1.4. Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Beschreibung	Verdünnung, Demaskierungszeit
IL-8	Abcam, England ab18672	Monoklonal, Maus	1:2350 17,00 min
LAG-3	Abcam, England ab209236	Monoklonal, Kaninchen	1:350 18,30 min
MMP3	Abcam, England ab52915	Monoklonal, Maus	1:1000 14,00 min
PD1	Abcam, England ab52587	Monoklonal, Maus	1:750 18,30 min
TIM 3	Abcam, England ab241332	Monoklonal, Kaninchen	1:5600 15,45 min

Tabelle 05: Verwendete Primärantikörper mit Herkunft und Beschreibung sowie Verdünnung und Demaskierungszeit nach speziellem Versuchsprotokoll.

7.1.5. Patientenkollektiv

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurde von ärztlichen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie sowie der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes ausgewählt, wobei histopathologisch diagnostiziert und somit sichergestellt wurde, dass es sich um Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region handelt. Das Kollektiv umfasste Tumore des Larynx, des Oropharynx, der Zunge, des Hypopharynx, des Mundbodens, der Rachenhinterwand und der Wangen. Die Patienten wurden im Vorfeld darüber informiert, dass ihr Gewebe nach den klinischen Untersuchungen beziehungsweise nach den therapeutischen Maßnahmen zu Forschungszwecken genutzt werden wird und sie haben dazu ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Kennziffer 280/10).

Die in Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben der ausgewählten HNSCC-Patienten beliefen sich am Ende auf eine Gesamtzahl von $n = 116$, wobei verschiedene Merkmale, wie der Vitamin D-Status und der HPV-Tumorstatus aus klinisch-pathologischen Patientendaten zusätzlich dokumentiert wurden. Alle eingeschlossenen Patienten wurden im Zeitraum zwischen August 2006 und Februar 2021 an der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt. Das Patientenkollektiv wurde unterteilt in zwei Gruppen, eine mit ausreichender (VitD-high) und eine mit mangelnder (VitD-low) Vitamin D-Versorgung. Zur Abgrenzung wurde ein Vitamin-D-Serumwert von 10ng/ml festgelegt, wobei schlussendlich 59 Patienten mit einem Vitamin-D-Spiegel $< 10\text{ng/ml}$, also einer mangelnden Versorgung und 57 Patienten mit einem Vitamin-D-Spiegel $\geq 10\text{ng/ml}$, also einer ausreichenden Versorgung in die Statistik eingeflossen sind. Zusätzlich wurde das Patientenkollektiv noch bezüglich des Vorhandenseins des Humanen Papillomvirus untersucht, wobei 22 Patienten einen positiven HPV-Nachweis und 94 Patienten einen negativen HPV-Nachweis zeigten. Der HPV-Status wurde dann als positiv bewertet, wenn das Tumorgewebe sowohl eine positive p16-Färbung in der immunhistochemischen Analyse (Analysen durch das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes) aufwies, als auch eine positive HPV-DNA-PCR aus Tumormaterial nach der GP5/6-Primer-Methode (Analysen durch das Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes) zeigte.

In der nachfolgenden Tabelle 06 werden die untersuchten HNSCC-Patienten mit ihrem Vitamin D-Status, ihrem Geschlecht, ihrer Diagnose, dem Datum der Erstdiagnose, dem TNM-Stadium (nach der 7. Version der TNM-Tumorklassifikation für maligne Kopf-Hals-Tumore) sowie ihrem HPV-Tumorstatus aufgeführt. Für die in der Tabelle angegebene TNM-Klassifikation wurde, sofern vorhanden, das pathologisch definierte T- und M-Stadium (Präfix „p“) angegeben. Bei primär nicht chirurgisch behandelten Patienten wurde entsprechend das klinisch definierte Stadium (Präfix „c“) verwendet.

Patienten-Nr.	Vitamin D (ng/ml)	G	Diagnose	Datum der Erstdiagnose	TNM-Stadium	HPV-Status
1	4,00	m	Tonsillen CA	Dezember 12	pT1 pN1 cM0	negativ
2	4,00	m	Zungengrund CA	Juli 16	cT3 cN2c cM0	negativ
3	4,00	m	Hypopharynx CA	April 16	cT2 cN0 cM0	negativ
4	4,00	m	Hypopharynx CA	Januar 15	cT4 cN2b cM0	negativ
5	4,00	m	Rachenhinterwand CA	Mai 15	cT3 cN1 cM0	negativ
6	4,00	w	Zungengrund CA	Oktober 15	pT4a pN2c cM0	negativ
7	4,00	m	Larynx CA	Mai 18	cT4b cN3b cM0	negativ
8	4,00	m	Larynx CA	Januar 19	cT2 pN0 cM0	negativ
9	4,20	w	Hypopharynx CA	März 16	cT3 cN0 cM0	negativ
10	4,50	m	Larynx CA	Januar 15	cT2 cN0 cM0	negativ
11	4,80	w	Larynx CA	Mai 13	pT1a cN0 cM0	negativ
12	4,80	m	Hypopharynx CA	März 16	pT4a pN2c cM0	negativ
13	4,80	m	Larynx CA	April 16	cT2 pN2b cM0	negativ
14	4,90	m	Tonsillen CA	Januar 15	cT4a cN2c cM0	negativ
15	5,00	m	Larynx CA	Mai 14	cT2 cN1 cM0	negativ
16	5,00	m	Larynx CA	September 18	cT3	negativ
17	5,30	m	Zungengrund CA	Juni 14	cT4 cN2c cM0	negativ
18	5,30	m	Zungen CA	Februar 15	cT3 cN1 cM1	negativ
19	5,30	m	Larynx CA	Januar 17	cT2 pN0 cM0	negativ
20	5,40	m	Mundboden CA	Mai 15	pT2 pN3 cM0	negativ
21	5,40	m	Zungengrund CA	März 16	pT1 pN2a cM0	positiv
22	5,40	m	Zungengrund CA	Mai 18	cT4a cN2c cM0	negativ
23	5,50	m	Larynx CA	Dezember 15	pT2 cN2b cM0	negativ
24	5,50	m	Oropharynx-/Larynx-/Hypopharynx CA	Januar 15	pT3 pN0	negativ
25	5,60	m	Hypopharynx-/Larynx CA	März 14	pT4a pN1 cM0	negativ
26	5,60	w	Tonsillen CA	Januar 15	cT3 cN2b cMx	positiv
27	5,80	m	Mundboden CA	August 14	pT1 pN0 cM0	negativ
28	5,80	w	Hypopharynx CA	Mai 15	cT2 cN3 cM0	negativ
29	5,80	m	Oro-/Hypopharynx CA	Juni 15	cT3 cN2c cM0	positiv
30	5,80	m	Larynx CA	Oktober 15	cT1a cN0 cM0	negativ
31	5,90	m	Larynx CA	Februar 15	cT2 pN1 cM0	negativ
32	5,90	m	Mundboden CA	März 16	cT2 pN0 cM0	negativ
33	6,10	m	Zungengrund CA	Februar 16	pT3 pN0 cM0	negativ
34	6,20	m	Zungengrund CA	November 14	pT2 pN1 cM0	negativ
35	6,50	m	Larynx CA	Mai 14	pT4a pN2c cM0	negativ
36	6,60	m	Larynx CA	Juni 15	cT4 cN0 cM0	negativ
37	6,60	m	Larynx CA	Mai 18	cT4a pN1 cM0	negativ
38	6,70	m	Larynx CA	Juli 14	cT2 pN2b cM0	negativ
39	6,80	m	Larynx CA	Juni 18	pT3 pN3b cM0	negativ
40	7,60	m	Larynx CA	Januar 14	cT2 cN0 cM0	positiv

41	7,80	m	Hypopharynx-/ Larynx CA	Juni 14	cT4 cN2b cM0	negativ
42	7,80	m	Larynx CA	Oktober 15	cT3 pN0 cM0	negativ
43	7,80	w	Hypopharynx CA	Februar 18	cT2 cN1 cM0	negativ
44	7,80	m	Zungengrund CA	Juli 18	cT4 cN2c cM0	negativ
45	8,00	m	Zungengrund CA	November 14	pT1 pN2b pM1	negativ
46	8,00	m	Zungengrund CA	Dezember 14	cT3 pN2b cM0	negativ
47	8,09	m	Tonsillen CA	März 13	cT2 cN2c cM0	negativ
48	8,20	m	Larynx CA	Dezember 15	cT3 cN0 cM0	negativ
49	8,29	w	Tonsillen CA	Oktober 12	pT2 pN2b cM0	negativ
50	8,40	m	Oropharynx- /Zungengrund CA	März 14	rcT2 pN1 cM0	negativ
51	8,50	m	Zungengrund CA	Oktober 14	cT4b cN3 cM1	negativ
52	8,60	m	Hypopharynx CA	Februar 16	cT2 pN0 cM0	negativ
53	8,70	m	Larynx CA	September 15	cT4 cN2b cM0	negativ
54	8,86	m	Zungengrund CA	Januar 13	cT2 pN2b cM0	negativ
55	9,00	m	Larynx CA	Juli 14	pT2 pN2b cM0	negativ
56	9,10	m	Uvula CA	Januar 16	pT2 pN2c cM0	negativ
57	9,20	m	Larynx CA	September 15	cT1a cN0 cM0	negativ
58	9,30	m	Larynx CA	April 14	cT2 cN2b cM0	negativ
59	9,90	m	Hypopharynx CA	April 14	pT2 pN2b cM0	negativ
60	10,80	m	Tonsillen CA	Februar 17	pT2 pN1 cM0	negativ
61	11,20	m	Tonsillen CA	Mai 16	cT2 pN2b cM0	positiv
62	11,60	m	Larynx CA	August 18	cT2 cN2b cM1	negativ
63	11,80	m	Tonsillen CA	April 18	cT2 cN2c M0	positiv
64	11,90	m	Larynx CA	April 17	pT2 pN0 cM0	negativ
65	12,60	m	Larynx CA	März 17	pT3 pN2b cM0	negativ
66	13,20	m	Tonsillen CA	Februar 17	pT2 pN1 cM0	positiv
67	13,20	m	Zungengrund CA	April 16	cT2 cN1 cM0	positiv
68	14,40	m	Zungengrund CA	Januar 17	cT3 pN3b cM0	positiv
69	15,30	m	Zungen CA	Juli 16	pT1 cN2b cM0	negativ
70	15,50	w	Larynx CA	März 14	pT1a cN0 cM0	negativ
71	15,70	m	Zungenrand CA	November 15	cT2 pN1 cM0	negativ
72	15,70	w	Tonsillen CA	Mai 18	pT4 cN3b cM1	negativ
73	15,80	w	Zungen CA	November 15	pT2 pN0 cM0	negativ
74	16,10	m	Larynx CA	Oktober 15	cT3 pN1 cM0	negativ
75	16,50	w	Tonsillen CA	Februar 16	cT4 pN2c cM0	negativ
76	16,60	m	Hypopharynx CA	Dezember 15	cT4 cN2b cM0	negativ
77	16,70	m	Tonsillen CA	September 16	cT4b cN2c cM0	positiv
78	16,80	m	Zungengrund CA	August 06	cT3 cN0 cM0	negativ
79	17,50	m	Tonsillen CA	Mai 16	cT3 cN2b cM0	positiv
80	18,10	m	Hypopharynx-/ Larynx CA	Mai 14	cT4 cN2c cM1	negativ
81	18,50	m	Zungengrund CA	Juni 13	rpT3 cN0 cM0	negativ
82	18,70	m	Larynx CA	Februar 14	cT3 cN0 cM0	negativ
83	18,70	w	Zungenrand CA	November 13	pT2 pN1 cM0	negativ
84	18,80	m	Zungen CA	Februar 14	pT2 pN2b cM0	negativ
85	19,40	m	Tonsillen CA	Februar 16	cT2 pN1 cM0	positiv
86	19,60	m	Zungengrund CA	März 18	cT2 cN2a cM0	positiv
87	19,70	m	Zungengrund CA	Mai 15	cT2 pN2b cM0	positiv
88	19,80	m	Tonsillen CA	Mai 15	cT3 cN2b cM1	positiv
89	20,80	m	Tonsillen CA	März 14	cT2 cN2b cM0	negativ
90	20,9	m	Weichgaumen CA	November 18	cT1 cN0 cM0	negativ
91	21,10	m	Tonsillen CA	November 15	cT3 cN2b cM0	negativ
92	21,50	m	Tonsillen CA	September 15	pT2 pN1 cM0	positiv
93	21,60	w	Tonsillen CA	September 15	cT1 pN0 cM0	positiv
94	21,80	m	Larynx CA	März 15	pT4a pN2c cM0	negativ
95	22,10	m	Larynx CA	Juli 14	pT1b cN0 cM0	negativ
96	22,10	w	Tonsillen CA	Dezember 15	cT4 pN2c cM0	negativ

97	22,80	w	Zungen CA	Oktober 15	pT1 pN0 cM0	negativ
98	23,40	m	Tonsillen CA	November 15	pT3 pN2c cM0	positiv
99	24,20	m	Tonsillen CA	Februar 18	ypT1 pN0 cM0	negativ
100	24,80	m	Hypopharynx CA	Dezember 18	cT3 pN3b cM0	negativ
101	25,10	m	Zungengrund CA	Juni 16	pT2 pN2b cM0	positiv
102	25,20	m	Mundboden CA	Juni 15	cT1 cN0 cM0	negativ
103	26,30	m	Weichgaumen CA	Mai 14	pT3 pN0 cM0	negativ
104	26,40	m	Stimmband CA	März 18	pT1 cN0 cM0	negativ
105	28,70	w	Zungengrund CA	März 13	cT4 cN2c cM1	negativ
106	28,7	m	Tonsillen CA	Juli 16	pT2 pN2b MX	positiv
107	29,60	m	Tonsillen CA	Mai 14	pT2 pN2b cM0	positiv
108	29,90	w	Tonsillen CA	Oktober 15	cT2 cN0 cM0	negativ
109	31,10	m	Zungen CA	Juni 14	pT2 pN2b cM0	negativ
110	31,10	m	Larynx CA	Februar 15	cT1a cN0 cM0	negativ
111	33,30	w	Wangen CA	Juli 14	pT2 pN0 cM0	negativ
112	36,30	m	Rachenhinterwand CA	April 18	pT3 cN0 cM0	negativ
113	38,20	w	Zungen CA	April 14	pT2 cN0 cM0	negativ
114	38,80	m	Hypopharynx CA	Juni 14	cT4 cN0 cM0	negativ
115	40,80	m	Zungengrund CA	November 13	pT1 pN2b cM0	positiv
116	64,10	m	Mundboden CA	August 15	cT2 pN2c cM0	negativ

Tabelle 06: Auflistung des untersuchten Patientenkollektivs mit klinisch-pathologischen Daten. Die untersuchten HNSCC-Patienten werden aufsteigend nach ihren Vitamin D-Serumwerten in dieser Tabelle sortiert. Zudem sind Patientendaten bezüglich des Geschlechts, der Diagnose, des Zeitpunktes der Erstdiagnose, des TNM-Stadiums (nach der 7. Version der TNM-Tumorklassifikation für maligne Kopf-Hals-Tumore) und des HPV-Status aufgeführt.

7.2. Immunhistochemische Färbungen

7.2.1. Verwendete Detektionssysteme für die Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde als Detektionssystem der mit dem Primärantikörper inkubierten Antigene das Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED benutzt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit dem Primärantikörper, dann mit dem im Dako REAL™ Link System enthaltenen biotinylierten Sekundärantikörper und zuletzt mit der ebenfalls im Dako REAL™ enthaltenen Streptavidin Alkaline Phosphatase entsprechend der Angaben des Herstellers inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch das ebenfalls im Kit enthaltene RED Chromogen sichtbar gemacht. Diese Chromogen-Substrat-Lösung sorgte für eine kontrastreiche Rotfärbung am vom Primärantikörper erkannten Zielantigen, was eine lichtmikroskopische Auswertung ermöglichte.

7.2.2. Vorbereitung der Gewebeproben für die immunhistochemischen Färbungen

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme aus dem Primärtumor des Patienten in PBS-gepuffertem (phosphatgepufferte Salzlösung), 4%igem-Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mithilfe des Tissue-Tek®VIPTM5JR wurde der Reagenz-

Transferprozess unterstützt, welcher in Tabelle 07 dargestellt ist. Die so generierten Paraffinblöcke wurden anschließend mittels des LEICA RM 2235 Rotationsmikrotoms geschnitten, wobei zunächst drei Schnitte von je 10µm angefertigt und verworfen und anschließend 4µm-Schnitte hergestellt wurden, welche später dann auch zur immunhistochemischen Färbung genutzt wurden. Die 4µm-Schnitte wurden kurze Zeit im Wasserbad gelagert, bevor sie dann auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgetragen und anschließend für 24h im Wärmeschrank mit 37° C zur optimalen Haftung am Objektträger getrocknet wurden.

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

Tabelle 07: Arbeitsschritte zur Gewebefixation. Aufgelistet sind das verwendete Reagenz, die Dauer in Stunden und die Temperatur in °C.

7.2.3. Etablierung der Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung

Um die Gewebeproben des Patientenkollektivs einheitlich und reproduzierbar immunhistochemisch zu färben, wurden im Vorfeld schrittweise Etablierungsversuche an entsprechenden FFPE-Gewebeschnitten von Patienten außerhalb des Kollektivs dieser Arbeit durchgeführt. Das Versuchsprotokoll als Grundlage der Etablierung wurde vorab von Herrn Dr. rer. nat. Florian Bochen (HNO-Forschungslabor, Universität des Saarlandes) entwickelt und hat sich bereits in mehreren Projekten zur Etablierung von Antikörpern in der Immunhistochemie im Forschungslabor der HNO-Klinik bewährt.

Im ersten Schritt der Etablierung wurden, wie bereits erwähnt, ausschließlich Präparate aus der eigenen Gewebebank des HNO-Labors gefärbt, damit keine wertvollen Präparate des späteren Patientenkollektivs verloren gingen. Unter den Präparaten waren Tonsillen und Lymphknoten von Nicht-Tumor-Patienten, sodass die Färbungen an verschiedenen Geweben und somit Immunzellpopulationen getestet und verglichen werden konnten. Dabei kam es zu verschiedenen Problemstellungen, die es schrittweise zu beheben galt. Bei den ersten Färbeversuchen war der Hintergrund häufig zu stark und unspezifisch gefärbt oder die

spezifischen Signale waren zu schwach. Die erste Stellschraube des Färbeprotokolls war jeweils die Auswahl des Retrieval-Puffers. Dabei stellte sich heraus, dass der Tris-EDTA-Retrieval-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 deutlich bessere Ergebnisse bei den Antikörpern TIM 3, IL-8, MMP3 und LAG-3 zeigte, wohingegen bei PD1 der Citrat-Retrieval-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 überlegen war. Anschließend wurde die Demaskierungszeit im Retrieval-Puffer angepasst und bei allen Antikörpern stufenweise verkürzt, mit dem Ergebnis, dass weniger unspezifische Färbungen bei kürzerer Demaskierung beobachtet wurden. Die unspezifischen Reaktionen wurden außerdem zusätzlich durch die Hinzugabe von Tween®20 in den Puffern minimiert, wobei dieses Detergens bei den Antikörpern MMP3, PD1 und IL-8 Anwendung gefunden hatte. Im letzten Schritt der Anpassung des Protokolls wurden die Antikörper-Verdünnungen optimiert, sodass die spezifischen Signale ausreichend stark, jedoch nicht zu intensiv dargestellt wurden. Zunächst wurden die Verdünnungsstufen der Antikörper auf Empfehlung des Herstellers (abcam plc., Cambridge, UK) genutzt. Die empfohlenen Verdünnungen waren 1:1000 bei den Antikörpern LAG-3 und TIM 3, sowie 1:50 bei den Antikörpern PD1 und MMP3. Bei dem Antikörper gegen LAG-3 erschienen mit der vorgeschlagenen Verdünnung von 1:1000 nicht genug spezifische Signale, sodass hier eine schwächere Verdünnung von 1:350 im finalen Protokoll genutzt wurde. Bei allen anderen Antikörpern hat die empfohlene Verdünnung zu sehr intensiven Färbungen geführt, sodass hier stärker verdünnt wurde. Im finalen Protokoll wurden somit Verdünnungen von 1:750 bei PD1, 1:1000 bei MMP3, 1:2350 bei IL-8 und 1:5600 bei TIM 3 verwendet.

Im letzten Schritt der Etablierung wurde Tumormaterial von HNSCC-Patienten, welches nicht in die spätere Auswertung einfließt, mit dem finalen Protokoll gefärbt und letzte minimale Anpassungen wurden vorgenommen. Durch diesen Zwischenschritt konnte eine gute Übertragung und Vergleichbarkeit der Färbeargebnisse vom Etablierungsmaterial aus Nicht-Tumorpatienten auf Tumormaterial gesichert werden. Das Tumormaterial des Patientenkollektivs konnte nach erfolgreicher Etablierung reproduzierbar gefärbt werden.

Die Etablierung der Färbeprotokolle der einzelnen Primärantikörper beinhaltete mehrere immunhistochemische Färbungen, welche mikroskopisch begutachtet und anschließend mittels einer Anpassung des Färbeprotokolls verändert wurden. Abbildung 03 zeigt eine Bilderreihe, in der die ersten Etablierungsversuche der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper MMP3 und die stufenweisen Anpassungen der Färbeprotokolle gezeigt werden. Die vier mikroskopischen Bilder der Bilderreihe (Abb. 03) zeigen immunhistochemisch gefärbte Tonsillen aus der Gewebebank des HNO-Labors, welche für die Etablierungsversuche genutzt wurden. Abbildung 04 zeigt die immunhistochemische Färbung von Tumormaterial eines HNSCC-Patienten, welches nicht in die spätere

Auswertung einfluss. Dies diente zur Überprüfung, ob das final etablierte Färbeprotokoll an HN5CC-Tumormaterial ebenso reproduzierbare Färbeargebnisse zeigen konnte.

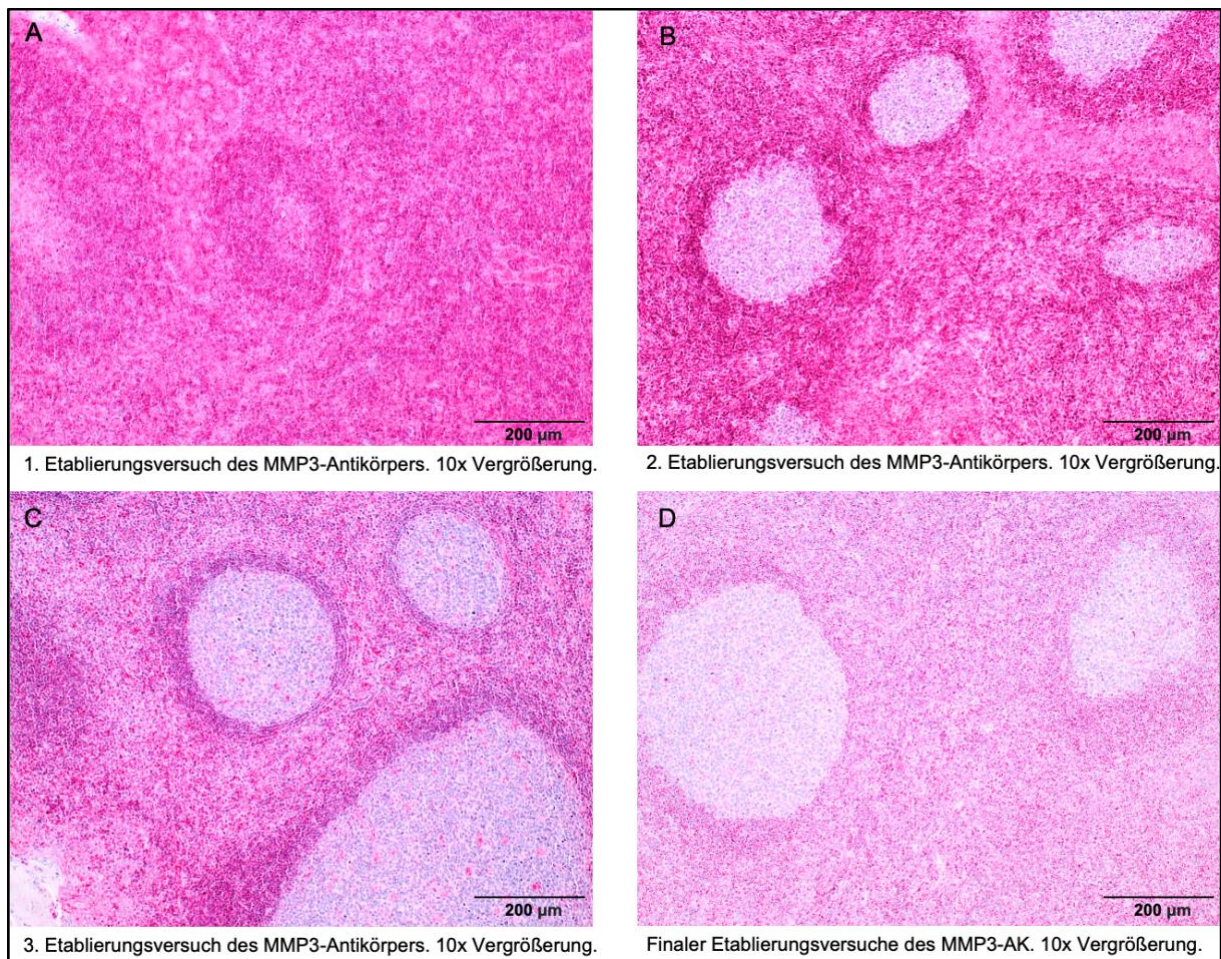


Abbildung 03: Bilderreihe der Etablierungsversuche des Primärantikörpers MMP3 an Tonsillen aus der Gewebekbank des HNO-Labors. Bild A: 1. Etablierungsversuch, Demaskierungszeit: 20min, Primär-AK-Verdünnung: 1:50, keine Nutzung von Tween@20. Bild B: 2. Etablierungsversuch, Demaskierungszeit: 18min, Primär-AK-Verdünnung: 1:400, keine Nutzung von Tween@20. Bild C: 3. Etablierungsversuch, Demaskierungszeit: 15min, Primär-AK-Verdünnung: 1:1000, keine Nutzung von Tween@20. Bild D: finaler Etablierungsversuch, Demaskierungszeit: 14min, Primär-AK-Verdünnung: 1:1000, mit Nutzung von Tween@20.

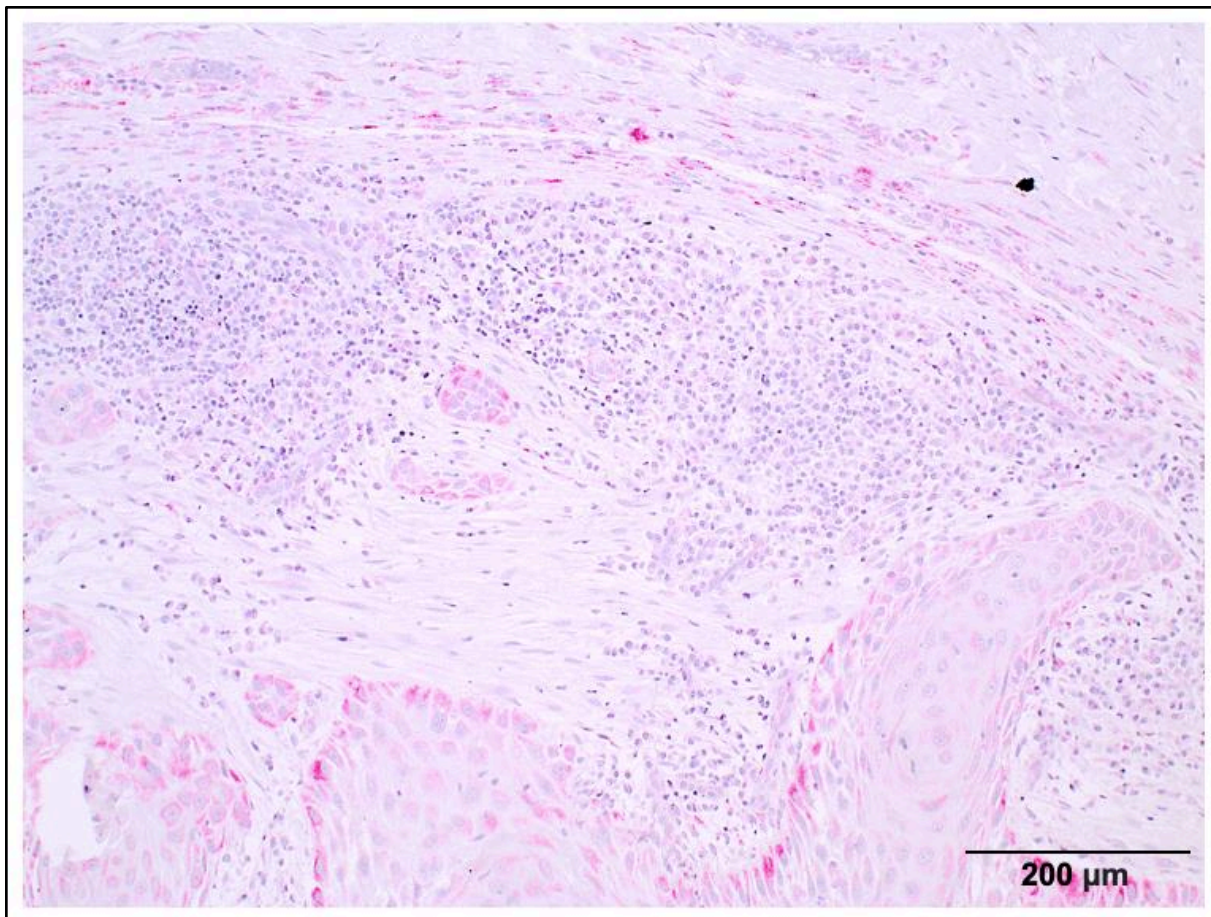


Abbildung 04: Etablierungsversuch des Primärantikörpers MMP3 an Tumormaterial eines HNSCC-Patienten, welches nicht in die spätere Analyse einfließt, im Rahmen der Etablierung des Färbeprotokolls. Demaskierungszeit: 14min, Primär-AK-Verdünnung: 1:1000, mit Nutzung von Tween®20. 10x Vergrößerung.

7.2.4. Immunhistochemische Färbungen

Nachdem die Versuchsvorbereitungen einschließlich der Auswahl der Gewebeproben, die Fixierung, das Schneiden und das Auftragen auf den Objektträger abgeschlossen waren, wurden die zu färbenden FFPE-Gewebeschnitte für 24 Stunden in einen Wärmeschrank bei 37°C getrocknet, um eine optimale Haftung auf dem Objektträger zu gewährleisten. Bei jeder Färbung wurde einerseits eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgefärbt, damit die Leistung der verwendeten Reagenzien sichergestellt werden konnte und andererseits wurde auch eine Negativkontrolle mitgefärbt, um eine unspezifische Färbung auszuschließen.

Am Tag der Färbung wurden die FFPE-Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert, indem sie zehn Minuten in Xylol und anschließend durch mehr-sekündiges Schwenken in einer Xylolreihe und einer absteigenden Alkoholreihe von 100%igem und 70%igem Alkohol auf das wässrige Milieu vorbereitet wurden. Nach der Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte für kurze Zeit in einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette

gelagert und gewaschen. Dieser Schritt diente der Entfernung des Einbettungsmediums, um eine unspezifische oder verminderte Färbung zu vermeiden. Danach erfolgte die wärmeinduzierte Epitopdemaskierung, indem die verwendete Pufferlösung (Tris-EDTA-Retrieval-Puffer; pH 9,0 oder Citrat-Retrieval-Puffer; pH 6,0) in einer Küvette mittels einer Mikrowelle erhitzt wurde und anschließend die Gewebeschnitte in einem Objektträgergestell in den erhitzten Puffer und somit dann zusammen in das auf >95°C erhitzte Wasserbad eines Reiskochers gestellt wurden. Die Temperatur wurde stets durch ein Thermostat kontrolliert und die jeweilige Inkubationszeit des Primärantikörpers zeitlich festgehalten. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 14 Minuten (MMP3) und 18,30 Minuten (PD1 und LAG-3). Nach abgelaufener Inkubationszeit im Wasserbad wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur bis auf eine Temperatur <50°C abgekühlt.

Es folgte ein 8-minütiger Waschvorgang in PBS-Puffer, sowie eine 30-minütige Inkubation mit 5% BSA in PBS oder 3% BSA in PBS (je nach speziellem Färbeprotokoll des Primärantikörpers), wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden, sodass die darauffolgende Bindung mit dem Primärantikörper verbessert werden konnte. Anschließend wurde der Primärantikörper in jeweiliger spezieller Verdünnung aufgetragen und die Präparate bei Raumtemperatur für 60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. In der nachfolgenden Tabelle 08 werden zur Veranschaulichung die fünf Primärantikörper mit ihren jeweils speziell etablierten Demaskierungszeiten, Verdünnungsstufen und Retrieval-Puffern dargestellt. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern folgte das Färbeprotokoll einem einheitlichen Schema.

Primär-AK	Retrieval-Puffer	Demaskierungszeit	Verdünnung
IL-8	Tris-EDTA Retrieval-Puffer, pH 9,0	17,00min	1:2350
LAG-3	Tris-EDTA Retrieval-Puffer, pH 9,0	18,30min	1:350
MMP3	Tris-EDTA Retrieval-Puffer, pH 9,0	14,00min	1:1000
PD1	Citrat Retrieval-Puffer, pH 6,0	18,30min	1:750
TIM 3	Tris-EDTA Retrieval-Puffer, pH 9,0	15,45min	1:5600

Tabelle 08: Verwendete Primärantikörper mit Retrieval-Puffer, Demaskierungszeit und Verdünnung nach speziellem Färbeprotokoll.

Es folgten die 30-minütige Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers, die 30-minütige Inkubation mit der Streptavidin Alkaline Phosphatase und anschließend die 14-minütige Färbung mittels Chromogen-Substrat, wobei vor jedem dieser drei Schritte ein 8-minütiger Waschvorgang mittels PBS (pH 7,2) durchgeführt wurde. Der biotinylierte Sekundärantikörper, die Streptavidin Alkaline Phosphatase und das Chromogen, welches eine kontrastreiche rote Färbung des erkannten Zielantigens erzeugt, stammten aus dem Dako REAL™ Detection System. Nach einem 5-minütigen Spülvorgang in destilliertem Wasser wurde eine 7-minütige Gegenfärbung mittels Sigma Aldrich alkoholfreiem Hämatoxylin durchgeführt, welche alle sauren zellulären Strukturen in Gewebe blau färbt und

anschließend erfolgte eine erneute Spülung für zehn Minuten unter fließendem Wasser. Schlussendlich wurden die Präparate durch jeweils 30-sekündiges Schwenken in der aufsteigenden Alkoholreihe von 70%igem und 100%igem Alkohol, sowie Xylolreihe wieder in ein lipidreiches Milieu gebracht und anschließend mit Entellan luftdicht eingedeckt.

Bei den Primärantikörpern IL-8, MMP3 und PD1 wurde zusätzlich Tween®20 in den Waschvorgängen, sowie in der 5%igen BSA-Blockierlösung und der 1%igen BSA-Primärantikörperlösung genutzt. Bei den Primärantikörpern LAG-3 und TIM 3 wurde kein Tween®20 verwendet, hier fand eine 3%ige BSA-Blockierlösung Anwendung.

In der folgenden Tabelle 09 wird das Versuchsprotokoll der immunhistochemischen Färbungen tabellarisch dargestellt.

Arbeitsschritt	Zeitangabe
Fixierung der Gewebeschnitte bei 37°C im Wärmeschrank	Über Nacht, mindestens 12h vor Färbeversuch
Entparaffinieren in Xylol	10min
Xylolreihe	3x30s Schwenken
Absteigende Alkoholreihe	3x30s Schwenken
Demaskieren im Reiskocher >95°C	Inkubationszeit je nach Primärantikörper unterschiedlich
Präparate in Küvette auskühlen lassen bis <50°C	Mindestens 30min
Waschen im PBS-Puffer; pH 7,2	4x2min
Blockierung mit 5%igem oder 3%igem BSA/PBS	30min
Primärantikörper inkubieren	60min
Waschen im PBS-Puffer; pH 7,2	4x2min
Biotinylierter Sekundärantikörper inkubieren	30min
Waschen im PBS-Puffer; pH 7,2	4x2min
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase inkubieren	30min
Waschen im PBS-Puffer; pH 7,2	4x2min
Substrat-Chromogen-Lösung inkubieren	14min
Spülen mit Aqua dest.	5min
Hämatoxylin-Gegenfärbung	7min
Fließend wässern	10min
Aufsteigende Alkoholreihe	3x30s Schwenken
Xylolreihe	3x30s Schwenken
Eindecken mit Entellan	

Tabelle 09: Arbeitsschritte des Färbeprotokolls für die immunhistochemischen Färbungen.

7.3. Analytische Methoden

7.3.1. Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Mikroskop

Nach den immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate im nächsten Schritt mikroskopisch analysiert und das Färbeergebnis quantifiziert, um eine Grundlage für die statistische Auswertung zu schaffen. Für die mikroskopische Auswertung wurde das Durchlichtmikroskop 4316184 der Firma Carl Zeiss AG genutzt. Beurteilt wurde zum einen die durch den jeweiligen Antikörper spezifisch dargestellte Leukozyten-Subpopulation, also der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Leukozyten in Relation zur Gesamtanzahl der Leukozyten und zum anderen die Farbintensität der positiven Leukozyten. Hierzu wurde der international anerkannte und regelhaft in der histopathologischen Auswertung von immunhistochemischen Färbungen genutzte immunreaktive Score (IRS) genutzt (Remmele & Stegner, 1987), welcher ursprünglich als Bewertungsskala zur Quantifizierung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren in Zellkernen von Mammakarzinomen als immunhistochemischer Hormonrezeptornachweis genutzt wurde. Der IRS setzt sich zusammen aus der Bewertung der Farbintensität, wobei ein Zahlenwert von null bis drei vergeben werden kann. Die Intensität der Färbung wird von keiner Reaktion, was den Zahlenwert null widerspiegelt, über eine schwache, eine mäßig starke bis hin zu einer starken Färbereaktion eingeteilt, welcher der Zahlenwert drei zugeordnet wird. Das zweite Bewertungsmerkmal des IRS ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen, wobei Zahlenwerte von null bis vier vergeben werden. Die prozentuale Einteilung reichte von 0% über <10%, 10-50% und 51-80% bis zu >80%. Die Bewertung der Farbintensität und die prozentuale Staffelung des Anteils an positiven Zellen sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Bewertung beider Merkmale wurde sowohl für den Bereich innerhalb des Tumors des Präparats durchgeführt (intratumoral) als auch den peritumoralen Bereich, um mögliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Leukozytenlokalisierung herauszuarbeiten und darstellen zu können.

Zahlenwert	Farbintensität	Anteil positiver Zellen
0	Keine Färbereaktion	0%
1	Schwache Färbereaktion	<10%
2	Mäßig starke Färbereaktion	10-50%
3	Starke Färbereaktion	51-80%
4	/	>80%

Tabelle 10: Zusammensetzung des immunreaktiven Scores (IRS).

Nach der Beurteilung und Einteilung beider Einzelkriterien des IRS wurden die Zahlenwerte miteinander multipliziert, so dass sich Scores zwischen null und zwölf ergaben. Beispielsweise bedeutet ein IRS von zwölf, dass >80% aller Leukozyten durch den Antikörper mit einer starken Intensität gefärbt worden sind.

Um die gewünschte Datenqualität zu erreichen, wurde bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Präparate das Vier-Augen-Prinzip angewendet und somit die gefärbten Gewebeschnitte des untersuchten Patientenkollektivs von der Verfasserin sowie zusätzlich dem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler unabhängig voneinander mikroskopiert und anhand des oben erklärten immunreaktiven Scores bewertet. Anschließend wurde aus den beiden immunreaktiven Scores der beiden Untersucher ein Mittelwert gebildet, welcher dann für die statistische Auswertung genutzt wurde. Beispielsweise wurde durch die eigene Analyse ein IR-Score von drei für ein Präparat vergeben und von Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler ein IR-Score von fünf, wodurch letztendlich ein Wert von vier in die spätere Statistik eingeflossen ist. Wenn die Abweichung beider vergebenen Zahlenwerte größer als fünf war, wurde das Präparat erneut gemeinsam begutachtet, um mögliche Ursachen für diese Differenz finden und den Score entsprechend anpassen zu können. Beide Untersucher waren bei der Auswertung der Präparate bezüglich der klinischen Daten der jeweiligen Patienten (z.B. Tumorlokalisierung, Vitamin D-Status, Überlebenszeit, HPV-Tumorstatus) verblindet, um einen Rosenthal-Effekt und somit eine Verfälschung der Auswertungsergebnisse auszuschließen.

7.3.2. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe der GraphPad Prism 7.0 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Das untersuchte Patientenkollektiv konnte anhand verschiedener Merkmale (HPV-Tumorstatus, Vitamin D-Status) in unterschiedliche Kohorten eingeteilt werden. Die statistische Analyse verglich mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests die IRS-Werte von zunächst zwei Kohorten (HPV-HNSCC-Patienten und HPV⁺-HNSCC-Patienten), während eine nächste statistische Analyse die IRS-Werte von zwei weiteren Kohorten des Patientenkollektivs (VitD-low-HNSCC-Patienten und VitD-high-HNSCC-Patienten) bei fehlendem Nachweis einer Normalverteilung der verschiedenen IRS-Werte für alle Antikörper, verglich. Sowohl der intratumorale als auch der peritumorale Bereich des Gewebepreparats wurden getrennt voneinander analysiert und diese Analysen wurden jeweils für alle fünf der untersuchten Primärantikörper wiederholt.

Außerdem wurden noch die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) ausgewertet. Hierbei wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der durch den entsprechenden Primärantikörper detektierten, spezifischen Immunzellinfiltration mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht. Hierzu wurden die Patienten je nach IRS-Werten in eine low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und eine high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) eingeteilt und das Gesamtüberleben der beiden Gruppen in einer Kaplan-Meier-Analyse verglichen. Der intratumorale Bereich im Präparat wurde getrennt analysiert von dem peritumoralen Bereich, sodass zwei separate Überlebensanalysen durchgeführt wurden. Statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ gewertet bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

8. Ergebnisse

8.1. Beschreibung des Patientenkollektivs

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv belief sich auf n = 116 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf Hals Bereich, welches gemeinsam mit dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes histopathologisch diagnostiziert und klassifiziert wurde. Zur Klassifizierung der Tumore wurde die siebte Version der TNM-Klassifikation maligner Kopf-Hals-Tumore genutzt, welche einer Stadieneinteilung der malignen Kopf-Hals-Tumore je nach Tumorgroße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen ermöglicht. Dabei zeigte sich im untersuchten Patientenkollektiv ein weites Spektrum, von einem cT1-cN0-cM0-Stadium bis hin zu einem cT4b-cN3-cM1-Stadium. Dabei entspricht ein TNM-Stadium von cT1-cN0-cM0, in diesem Fall eines glottischen Larynxkarzinoms, dass in der klinischen Bewertung (Präfix „c“) der Tumor auf die Stimmlippe begrenzt ist und die Stimmlippen weiterhin beweglich sind, dass es zu keinen regionären Lymphknotenmetastasen gekommen ist und dass keine Fernmetastasen vorliegen. Ein weit fortgeschrittenes Stadium, wie das beispielhaft genannte cT4b-cN3-cM1 Stadium eines Tonsillenzarzinoms sagt aus, dass der Tumor die Organgrenze überschritten und die prävertebrale Faszie und/oder das Mediastinum und/oder die Arteria carotis interna infiltriert hat, dass es >6cm große Metastasen in den regionären Lymphknoten gibt und dass es zu einer Fernmetastasierung gekommen ist.

Da die Patienten in dieser Arbeit überwiegend vor dem Jahr 2017 diagnostiziert wurden, wurde nicht die seit 2017 geltende achte Version der TNM-Klassifikation maligner Kopf-Hals-Tumoren verwendet, die insbesondere bezüglich der Berücksichtigung des HPV-Tumorstatus der Patienten Änderungen im Vergleich zur siebten Version vorsieht, sondern die siebte Version, welche im Folgenden gezeigt wird (Abbildung 05 und 06).

Stadieneinteilung		Lymphknoteneinteilung	
Karzinome der Schleimhaut außer Nasopharynx		Nasopharynxkarzinome	
Stadium	TNM	Stadium	TNM
I	T1, N0, M0	I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0	II	T1, N1, M0
III	T1, N1, M0	III	T2, N0-1, M0
	T2, N1, M0		T1, N2, M0
IVA	T3, N0-1, M0	IVA	T2, N2, M0
	T1-3, N2, M0		T3, N0-2, M0
IVB	T4a, N0-2, M0	IVB	T4, N0-2, M0
	jedes T, N3, M0		jedes T, N3, M0
IVC	T4b, jedes N, M0	IVC	jedes T, jedes N, M1
	jedes T, jedes N, M1		
Residualtumor			
<ul style="list-style-type: none"> • RX Residualtumor nicht bestimmbar • R0 kein Residualtumor • R1 mikroskopischer Residualtumor • R2 makroskopischer Residualtumor 			
		LK-Stationen <ul style="list-style-type: none"> • 1 submental • 2 submandibulär • 3 kranial jugulär • 4 medial jugulär • 5 kaudal jugulär • 6 dorsal zervikal • 7 supraclavikulär • 8 präalaryngeal/ -tracheal 	
		Level <ul style="list-style-type: none"> la lb II III IV V VI 	
		N-Kategorie <ul style="list-style-type: none"> • N0 keine LK-Metastase • N1 ein ipsilat. LK ≤3cm • N2a ein ipsilat. LK >3cm ≤6cm • N2b multiple ipsilat. LK ≤6cm • N2c multiple bilat. LK ≤6cm • N3 LK >6cm 	

Abbildung 05: 7. Version der TNM-Klassifikation für maligne Kopf-Hals-Tumore.

Mundhöhle		Nasopharynx			
Bezirke bukkale Mukosa oberer Alveolarkamm unterer Alveolarkamm harter Gaumen Zunge Mundboden		T-Kategorie T1 auf Nasopharynx begrenzt oder mit Ausbreitung auf Oropharynx u/o Nasenhöhle T2 Parapharyngeale Ausbreitung T3 Infiltration von Knochenstrukturen der Schädelbasis u/o Nasennebenhöhlen T4 T4 intrakranielle Infiltration, u/o Hirnnerven, Fossa infratemporalis,			
T-Kategorie T1 ≤2cm T2 >2cm ≤4cm T3 >4cm T4a Infiltration durch kortik. Knochen, in Zungenmuskulatur, Kieferhöhle, Gesichtshaut T4b Infiltration in Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus, Schädelbasis, A. carotis interna		N-Kategorie N1 unilat. Metastase(n) Hals LK u/o bilat. Metastase(n) retropharyng. LK ≤6cm, kranial Supragrube N2 bilat. Metastase(n), Hals LK ≤6cm, kranial Supragrube N3a LK >6cm N3b in Supragrube			
Oropharynx		Hypopharynx			
T-Kategorie T1 ≤2cm T2 >2cm ≤4cm T3 >4cm oder Ausbreitung linguale Oberfläche Epiglottis T4a Infiltration Nachbarstrukturen (Larynx, Zungenmuskulatur, harter Gaumen, Unterkiefer) T4b Infiltration Nachbarstrukturen (M. pterygoideus lat., Schädelbasis, A. carotis interna)		T-Kategorie T1 begrenzt auf einen Unterbezirk u/o ≤2cm T2 begrenzt auf zwei Unterbezirke u/o >2cm ≤4cm T3 >4cm oder Fixation des Hemilarynx T4a Infiltration Nachbarstrukturen (Schilddrüse, Ösophagus, Halsgefäßscheide) T4b Infiltration prävertebrale Fasie oder A. carotis interna oder Strukturen Mediastinum			
Larynx					
Bezirke: • Supraglottis Epiglottis, Aryepiglottische Falte, Aryknorpel, Taschenfalten • Glottis Stimmlippen, vordere/hintere Kommissur • Subglottis					
T-Kategorie Supraglottis		T-Kategorie Glottis		TT-Kategorie Subglottis	
T1	auf Supraglottis begrenzt, normale SL-Beweglichkeit	T1	auf SL begrenzt T1a eine SL T1b beide SL	T1	auf Subglottis begrenzt, normale SL-Beweglichkeit
T2	überschreitet Supraglottis, normale SL-Beweglichkeit	T2	erreicht Sub- oder Supraglottis, normale oder eingeschränkte SL-Beweglichkeit	T2	erreicht Stimmlippe, normale oder eingeschränkte SL-Beweglichkeit
T3	SL Fixation ober Überschreitung laryngealer Grenzen (Postkrikoid)	T3	SL Fixation, auf Larynx begrenzt, u/o Infiltration Postkrikoid, u/o präepiglottisches Gewebe	T3	SL Fixation, auf Larynx begrenzt, u/o Infiltration Postkrikoid, u/o präepiglottisches Gewebe
T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)	T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)	T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)
T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis interna	T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis interna	T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis interna

Abbildung 06: 7. Version der TNM-Tumorklassifikation für maligne Tumore der Kopf-Hals-Region anhand von Beispielen, wie der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx.

Mithilfe der TNM-Stadien konnten die Patienten zusätzlich in UICC-Stadien (Union Internationale Contre le Cancer) eingeteilt werden. In dieser Arbeit wurden Patienten mit einem UICC-Stadium von Stadium I bis zum Stadium IVc untersucht. In Tabelle 12 wird beispielhaft für das Larynxkarzinom dargestellt, wie die UICC-Stadien anhand der TNM-Klassifikation ermittelt werden.

Stadieneinteilung der UICC beim Larynxkarzinom	
UICC-Stadien	TNM
Stadium 0	CIS (Carcinoma in situ)
Stadium I	T1
Stadium II	T2
Stadium III	T3 oder N1
Stadium IVa	T4a oder N2
Stadium IVb	T4b oder N3
Stadium IVc	M1

Tabelle 11: UICC-Stadien am Beispiel des Larynxkarzinoms.

Die Primärtumorlokalisation der eingeschlossenen Patienten schloss verschiedene Entitäten ein, wobei die meisten Tumore im Larynx lokalisiert waren, gefolgt von der Zunge (Zungengrund und Zungenrand) dem Oropharynx (davon die meisten in den Tonsillen, außerdem Karzinome des Gaumens, der Uvula und der Stimmbänder), dem Hypopharynx, dem Mundboden, der Rachenhinterwand sowie der Wangenschleimhaut. Darüber hinaus zeigten sechs Patienten des Kollektivs Karzinome in mehreren Lokalisationen, welche anatomische Grenzen überschritten, wie beispielsweise Tumore des Hypo- und Oropharynx. In Abbildung 07 werden die Tumorlokalisationen des untersuchten HNSCC-Patientenkollektivs dargestellt.

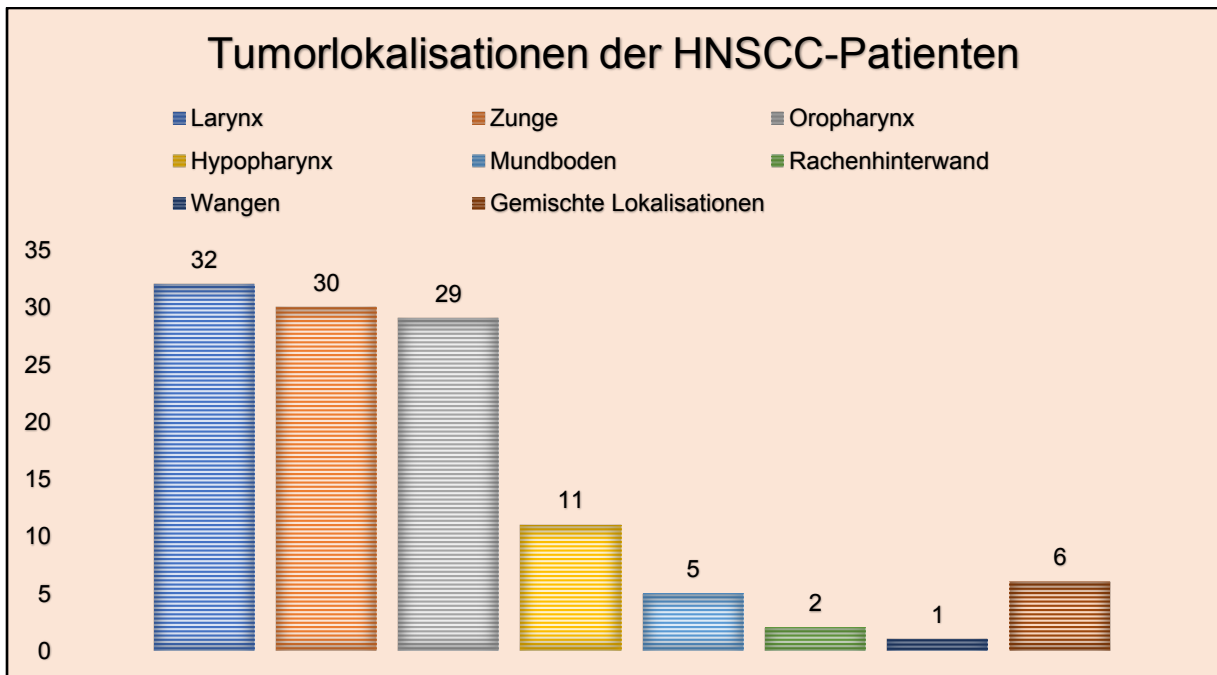


Abbildung 07: Häufigkeiten der Tumorlokalisationen im untersuchten Patientenkollektiv. Von den 116 untersuchten HNSCC-Patienten zeigten die meisten Patienten ein Karzinom des Larynx, gefolgt von Karzinomen der Zunge und des Oropharynx.

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 97 Männern mit einem Durchschnittsalter von 64,46 Jahren und 19 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 62,79 Jahren (Abbildung 08). Das Alter wurde jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Tumorerkrankung ermittelt.

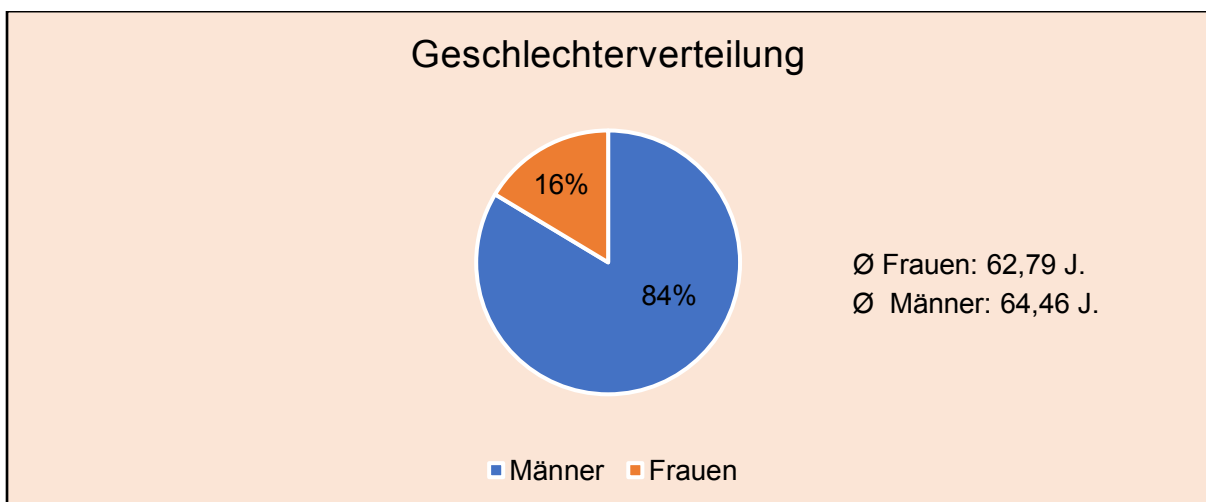


Abbildung 08: Geschlechterverteilung und Durchschnittsalter im untersuchten Patientenkollektiv. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus 97 Männern mit einem Durchschnittsalter von 64,46 Jahren und 19 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 62,79 Jahren. Die Altersangabe bezieht sich auf den Zeitpunkt der Erstdiagnose des Malignoms.

94 Patienten hatten einen HPV-Tumor, während 22 Patienten des Kollektivs einen HPV⁺-Tumor aufwiesen (Abbildung 09). Zusätzlich konnte das Patientenkollektiv noch unterteilt werden in Patienten mit einem Vitamin D-Mangel (VitD-low) und einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung (VitD-high), wobei dieses Merkmal annähernd ausgeglichen verteilt war, bei 59 VitD-low-Patienten und 57 VitD-high-Patienten (Abbildung 10).

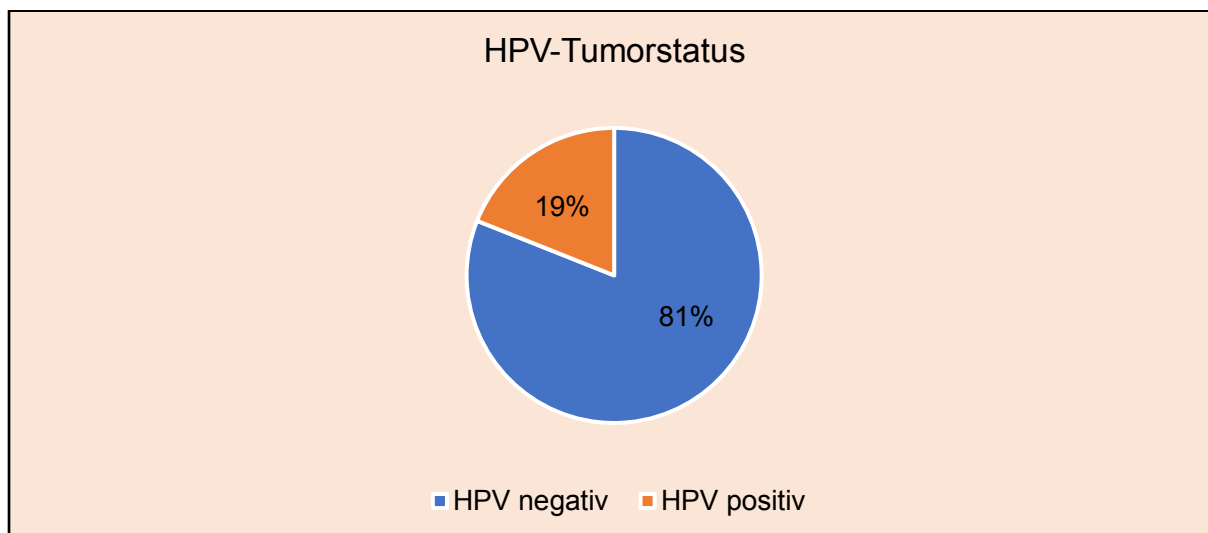


Abbildung 09: Verteilung des HPV-Tumorstatus im untersuchten Patientenkollektiv. 94 HNSCC-Patienten hatten einen negativen HPV-Tumorstatus, während 22 Patienten einen positiven HPV-Tumorstatus aufwiesen.

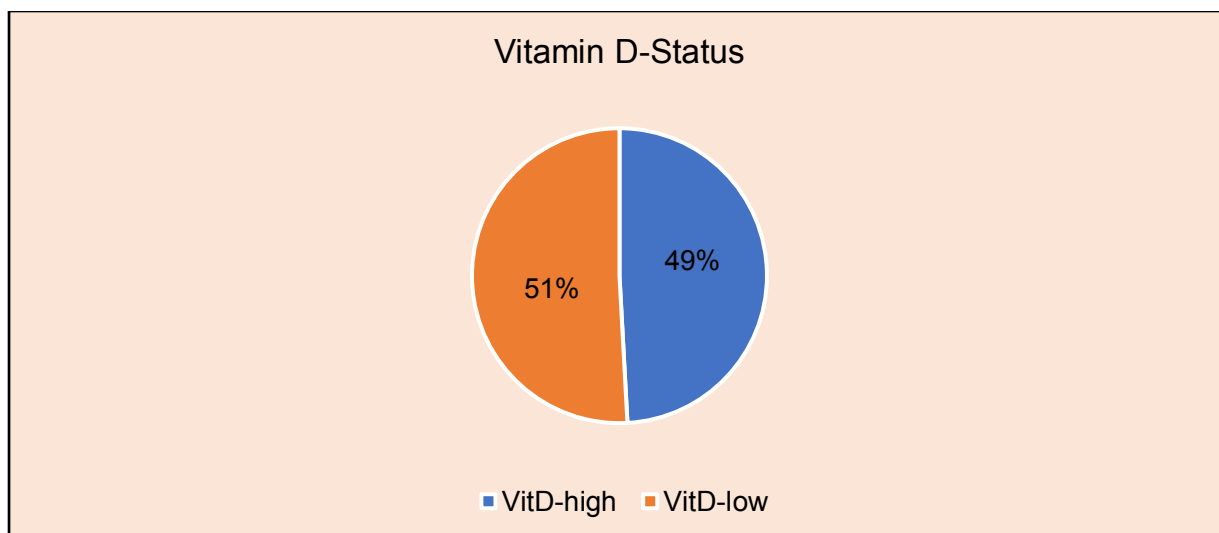


Abbildung 10: Verteilung des Vitamin D-Status im untersuchten Patientenkollektiv. Der Vitamin D-Serumwert als untersuchtes Merkmal in dieser Arbeit war bei dem untersuchten Patientenkollektiv sehr ausgeglichen. Es gab 59 VitD-low-Patienten und 57 VitD-high-Patienten.

8.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von IL-8

In Abbildung 11 ist eine Bilderreihe der mit IL-8-gefärbten HNSCC-Gewebepräparate dargestellt, die exemplarisch zeigen soll, welche Spannweite die immunhistochemischen Färbungen aufwiesen. In einem roten Farbton erscheinen die Immunzellen, die durch den IL-8-Primärantikörper detektiert werden, wozu vor allem Makrophagen und Monozyten zählen. Die Plattenepithelkarzinome sind an der von dem gesunden Epithel abweichenden morphologischen Struktur zu erkennen, welche sich in Form von Tumorzellinseln und Tumorzellsträngen darstellen lässt und ein Zeichen für invasives Wachstum darstellt.

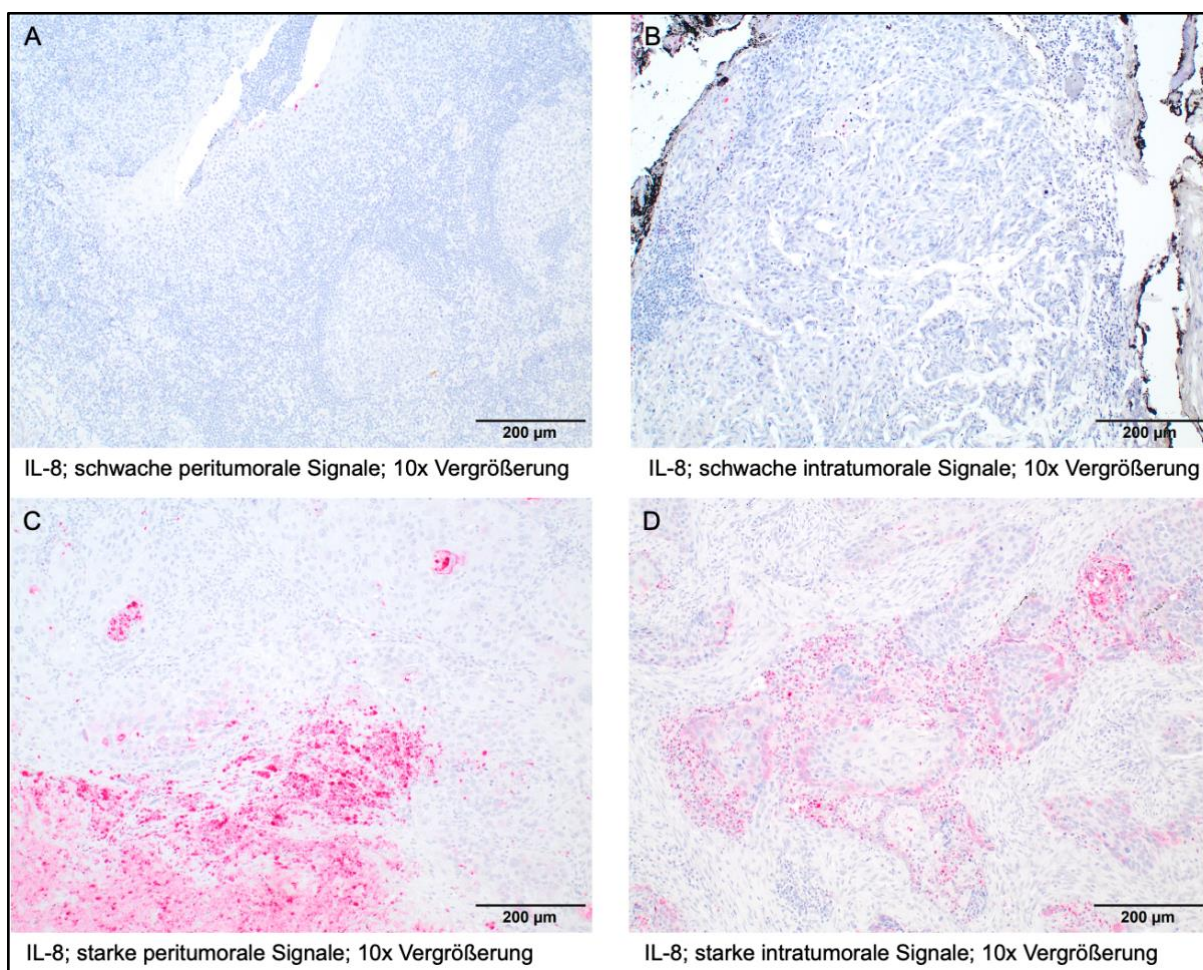


Abbildung 11: Exemplarische Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper IL-8. Auf der linken Seite der Bilderreihe (A, C) werden Immunzellinfiltrationen im peritumoralem Bereich des Präparats dargestellt. Patient A: VitD-high und HPV⁺. Patient C: VitD-high und HPV⁻. Auf der rechten Seite der Bilderreihe (B, D) werden Immunzellinfiltrationen im intratumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient B: VitD-low und HPV⁻. Patient D: VitD-low und HPV⁻. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate der Patienten C und D zeigen stark gefärbte Immunzellinfiltrationen, was mikroskopisch mit einem höheren IR-Score bewertet wurde.

8.2.1. Abhängigkeit der IL-8-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus

Der Mann-Whitney-U-Test wurde genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die Immunzellinfiltration je nach Vorhandensein des HP-Virus der HNSCC-Patienten unterscheiden. Dies wurde je nachdem, wo sich die Immunzellinfiltration im Gewebepräparat befand, unterteilt in den Bereich um den Tumor herum (peritumoral) und der Lokalisation im Tumor (intratumoral), resultierend in zwei separaten statistischen Analysen.

Die p-Werte beider Analysen waren mit Werten $> 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die peritumoralen und intratumoralen Immunzellinfiltrationen zeigten keine positiven Korrelationen zwischen einem positiven HPV-Tumorstatus und höheren IRS-Werten, was durch die statistisch nicht signifikanten p-Werte von $p = 0,8391$ (peritumoral) und $p = 0,1580$ (intratumoral) bestätigt wird. In der peritumoralen Analyse betrug der Median der IRS-Werte der HPV⁺-Patienten ($n = 21$) 1,5 und der Median der IRS-Werte der HPV⁻-Patienten ($n = 91$) ebenfalls 1,5. In der intratumoralen Analyse betrug der Median des IRS der HPV⁺-Patienten ($n = 21$) 1,0 und der Median des IRS der HPV⁻-Patienten ($n = 91$) 2,0. Die statistische Auswertung der durch IL-8 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus wird in Abbildung 12 dargestellt.

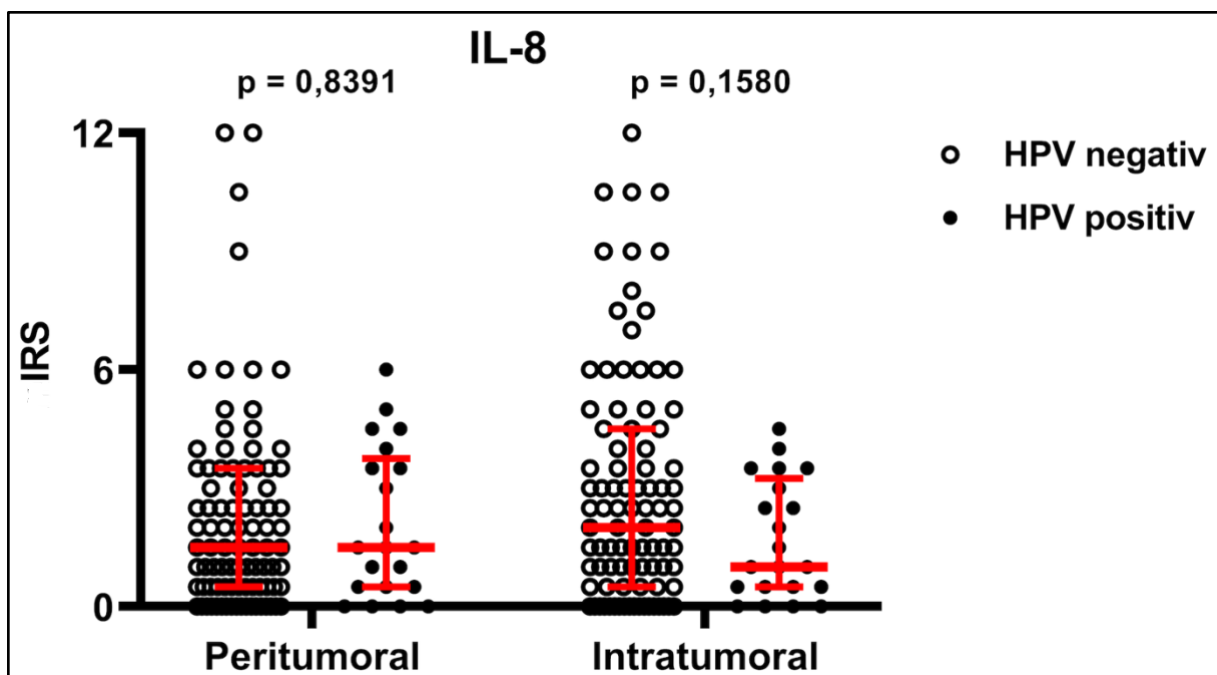


Abbildung 12: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der IL-8-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 wiederspiegelt. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die HPV⁺-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten Kreise stehen für die HPV⁻-HNSCC-Patienten des untersuchten

Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch Ausschnitte zweier Gewebepreparate, in der die intratumorale Immunezellinfiltration von zwei HPV-HNSCC-Patienten abgebildet wird. Trotz des gleichen HPV-Tumorstatus (beide negativ) erscheint bei Patient A eine schwache intratumorale Immunezellinfiltration, während bei Patient B viele intratumorale Immunezellen eine zudem starke IL-8-Expression zeigen.

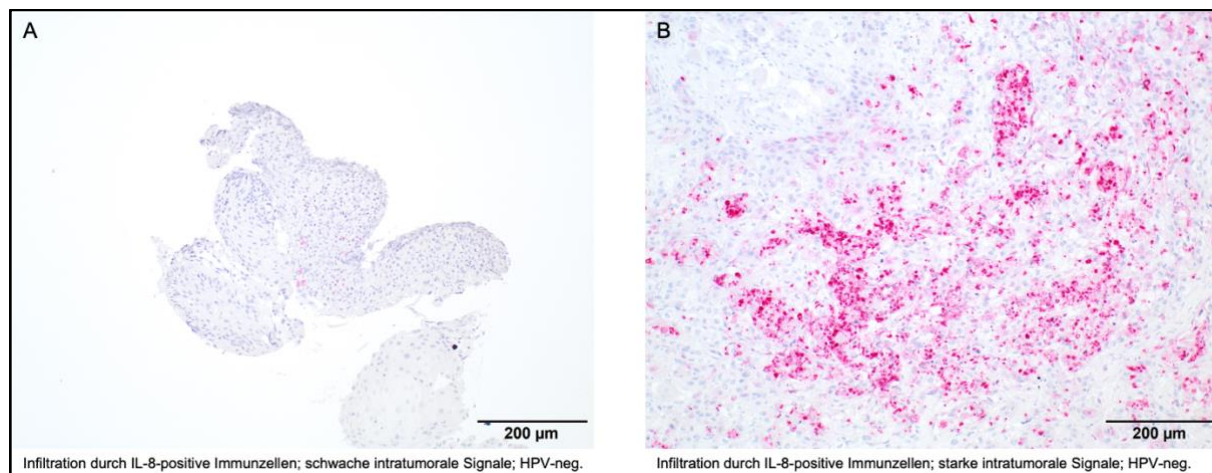


Abbildung 13: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HPV-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch IL-8⁺-Immunezellen. In Bild A ist die IL-8-Expression kaum und nur schwach sichtbar, während Bild B eine starke intratumorale Immunezellinfiltration IL-8⁺-Immunezellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.2.2. Abhängigkeit der IL-8-Expression auf intra- und peritumoralen Immunezellen vom Vitamin D-Status

Auch bei der statistischen Analyse des Vitamin D-Status wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) je nach Höhe der Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten unterscheiden. Das Patientenkollektiv wurde dafür in zwei Gruppen, abhängig von ihren Vitamin D-Serumwerten, eingeteilt, die zuvor bestimmt wurden. Es wurde unterschieden zwischen einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten < 10ng/ml (VitD-low) und einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten ≥ 10ng/ml (VitD-high). Für die intra- und peritumoralen Immunezellen wurden separate statistische Analysen durchgeführt.

Es konnten mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (VitD-high vs. VitD-low) nachgewiesen werden, weder für die IL-8⁺-peritumoralen noch für die IL-8⁺-intratumoralen Immunezellen. Die p-Werte betragen p =

0,9452 (peritumoral) und $p = 0,8164$ (intratumoral). In der peritumoralen Analyse betrug der Median der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) 1,5 und der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) ebenfalls 1,5. In der intratumoralen Analyse betrug der Median der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) 2 und der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) ebenfalls 2. Die statistische Auswertung der durch IL-8 detektierten Immunezellinfiltration in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status wird in Abbildung 14 dargestellt.

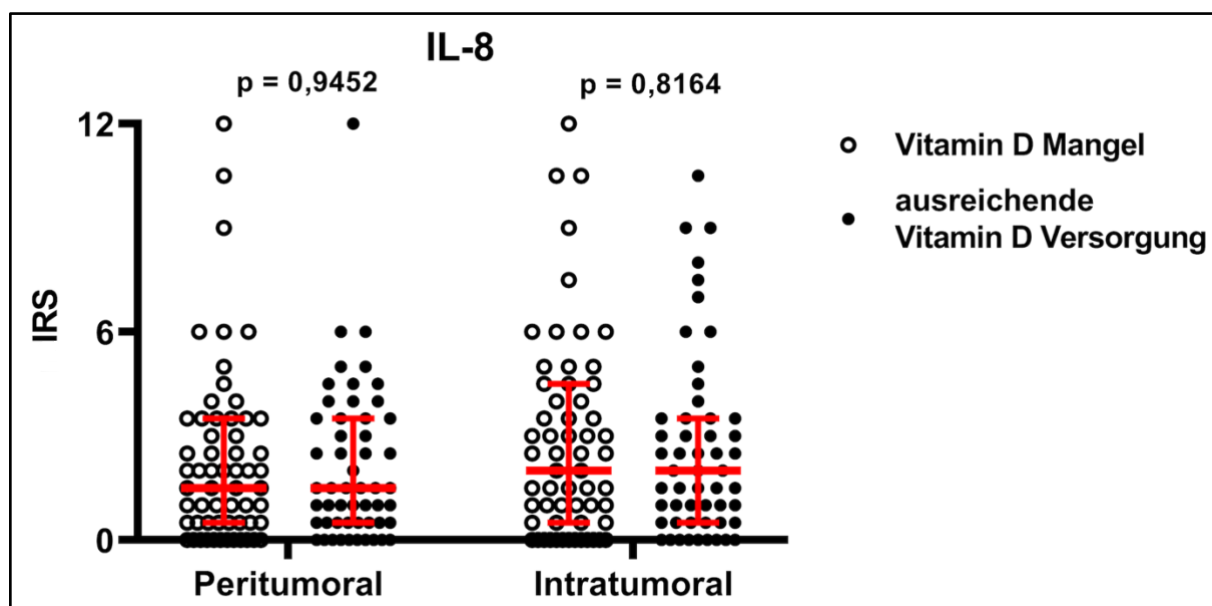


Abbildung 14: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der IL-8-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 aufgetragen. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-high-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-low-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die folgende Abbildung 15 zeigt Ausschnitte zweier Gewebepreparate von HNSCC-Patienten, die der VitD-low-Gruppe zugeordnet wurden und somit einen Vitamin D-Serumwert $< 10\text{ng/ml}$ aufwiesen. Trotz der vergleichbaren Vitamin D-Serumspiegel zeigt das immunhistochemisch gefärbte Gewebepreparat des einen HNSCC-Patienten (A) eine schwache Immunezellinfiltration und das des anderen HNSCC-Patienten (B) eine starke Infiltration durch IL-8⁺-Immunzellen.

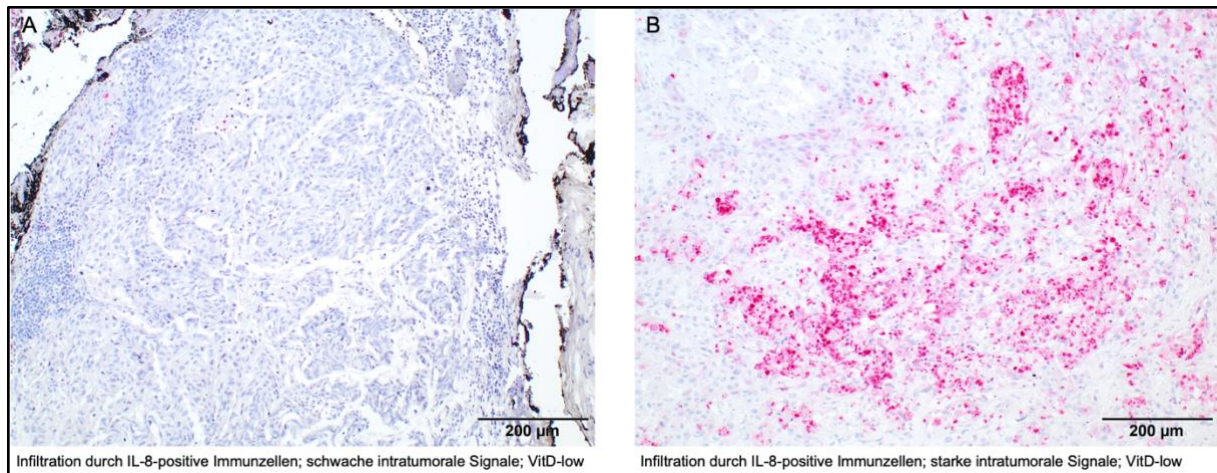


Abbildung 15: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch IL-8⁺-Immunzellen. In Bild A ist die IL-8-Expression kaum und nur schwach sichtbar, während Bild B eine starke IL-8-Expression der intratumoralen Immunzellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.2.3. Einfluss der IL-8-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben

Die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs wurden mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) ausgewertet, wobei ein möglicher Zusammenhang der, durch den Primärantikörper IL-8 detektierten, spezifischen Immunzellinfiltration (Makrophagen, Monozyten) mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht wurde. Dafür wurden die Patienten vorab in eine low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und eine high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) eingeteilt und diese beiden Gruppen miteinander verglichen. Der intratumorale Bereich im Präparat wurde getrennt analysiert von dem peritumoralen Bereich, sodass zwei separate Überlebensanalysen durchgeführt wurden. In der intratumoralen Analyse wurden 45 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 71 HNSCC-Patienten in der low-Expressionsgruppe zugeordnet und in der peritumoralen Analyse wurden 52 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 64 HNSCC-Patienten der low-Expressionsgruppe zugeordnet. In den Abbildungen 16 und 17 werden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

In Abbildung 16 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die peritumorale Analyse dargestellt, die zeigt, dass die Intensität und Menge der IL-8-Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten haben. Der p-Wert des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) betrug $p = 0,2093$ und der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests $p =$

0,0994. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ sind beide Tests somit statistisch nicht signifikant und es konnte kein Unterschied zwischen der Low-Expressionsgruppe und der High-Expressionsgruppe im Gesamtüberleben gezeigt werden. Das mediane Überleben beider Gruppen konnte statistisch nicht erhoben werden, da die Überlebensraten nach der letzten Abfrage der Studienteilnehmer und somit dem Eintreffen des Ereignisses bei $> 50\%$ lagen („Median undefined“). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei der Low-Expressionsgruppe 1,5, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,67 betrug.

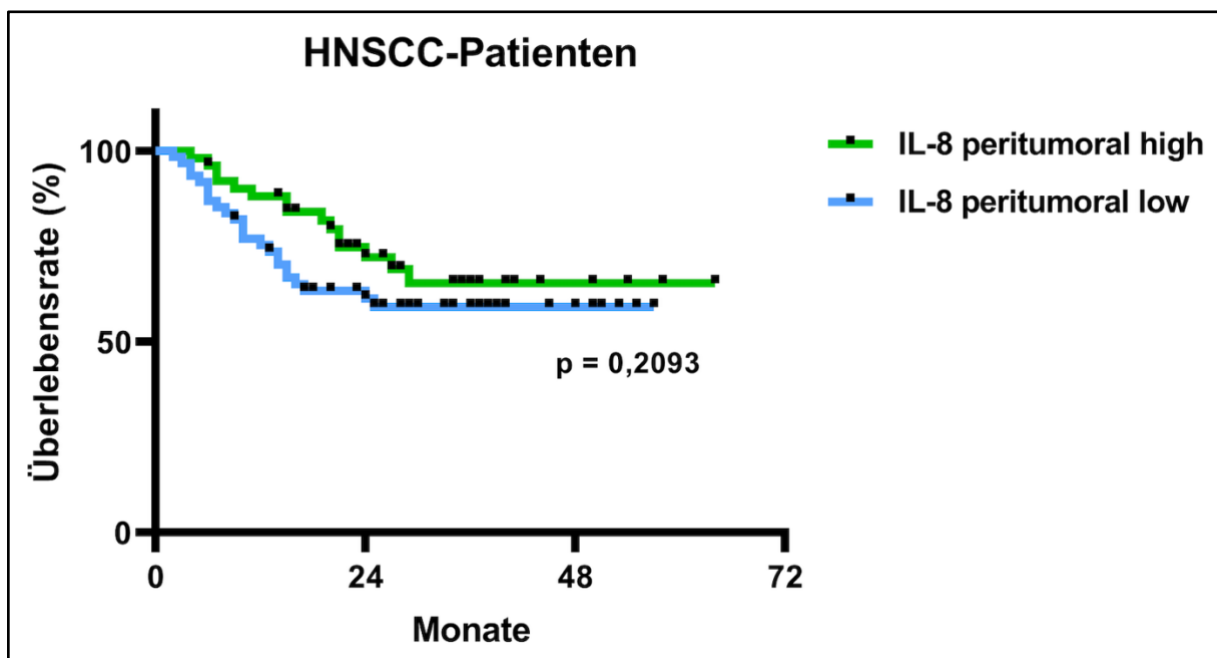


Abbildung 16: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der IL-8-Expression der peritumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der IL-8-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die IL-8-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,2093$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

In Abbildung 17 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die intratumorale Analyse dargestellt und auch hier kann mit einem p-Wert von $p = 0,8008$ des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) statistisch kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten bei einer starken IL-8-Expression im Vergleich zu einer schwachen IL-8-Expression gezeigt werden. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests betrug $p = 0,9413$. Auch hier konnte das mediane Überleben statistisch nicht errechnet werden. Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) lag bei der Low-Expressionsgruppe bei 0,92, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 1,09 betrug.

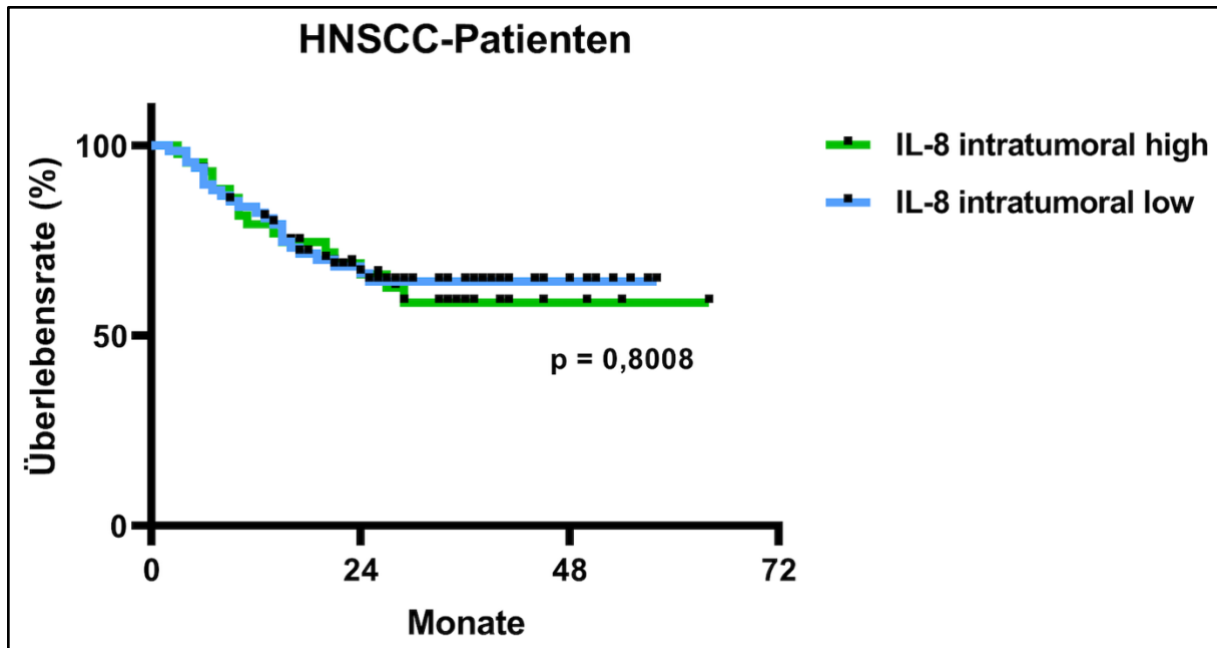


Abbildung 17: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der IL-8-Expression der intratumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der IL-8-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die IL-8-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,8008$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

8.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von MMP3

Auch für die Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von MMP3 wird zunächst eine Bilderreihe (Abbildung 18) der gefärbten Gewebepreparate dargestellt, um die Spannweite der immunhistochemischen Färbungen zu zeigen. Immunzellen, wie T-Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen produzieren MMP3 und können durch die immunhistochemische Färbung mit dem MMP3-Primärantikörper detektiert werden. Sie erscheinen anschließend in der mikroskopischen Analyse in einem Magenta-Farbtönen. Die Plattenepithelkarzinome sind an der vom gesunden Epithel abweichenden morphologischen Struktur zu erkennen, welche sich in Form von Tumorzellinseln und Tumorzellsträngen darstellen lässt und ein Zeichen für invasives Wachstum darstellt.

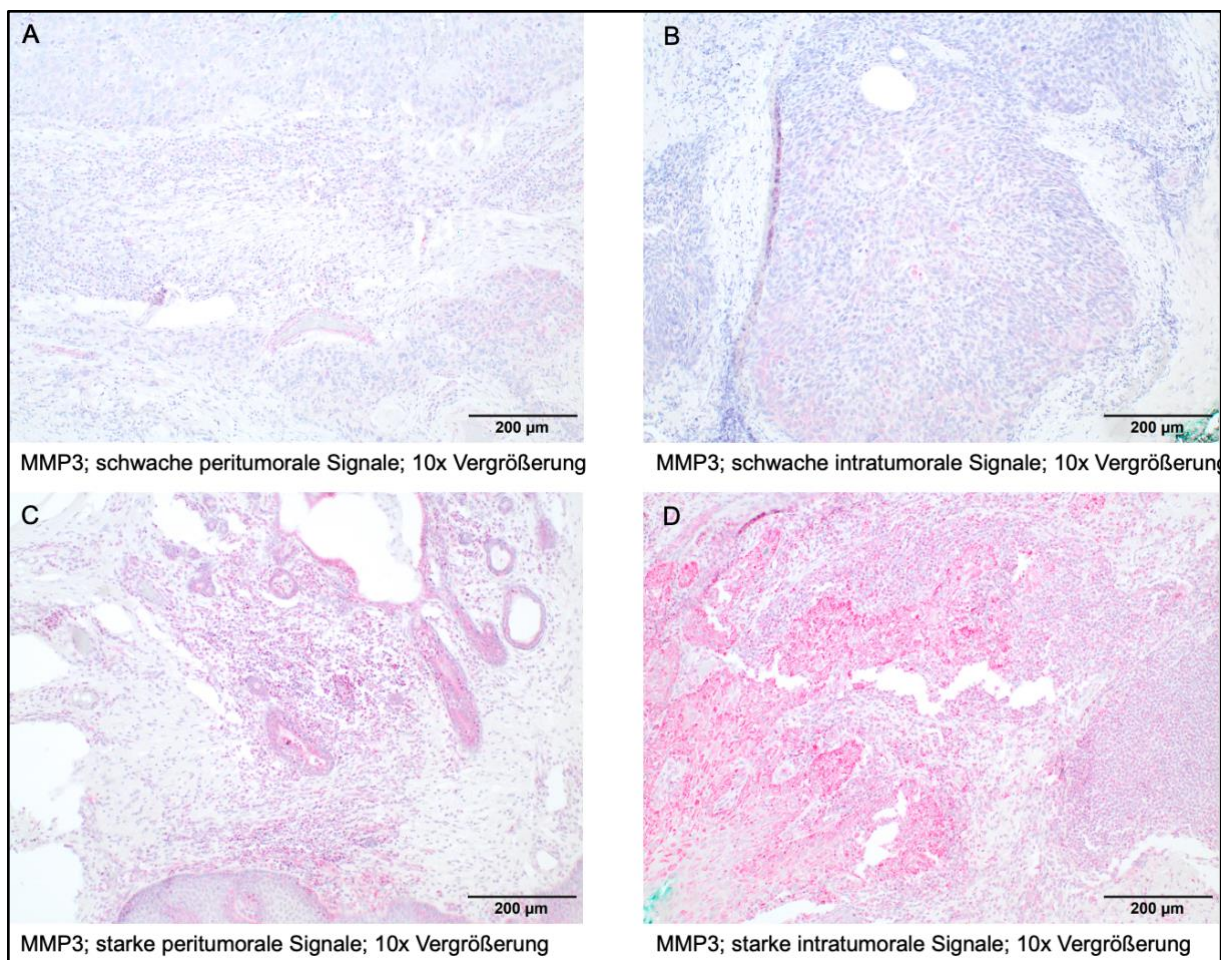


Abbildung 18: Exemplarische Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper MMP3. Auf der linken Seite der Bilderreihe (A, C) werden die Immunzellinfiltrationen im peritumoralem Bereich des Präparats dargestellt. Patient A: VitD-low und HPV⁻. Patient C: VitD-high und HPV⁻. Auf der rechten Seite der Bilderreihe (B, D) werden die Immunzellinfiltrationen im intratumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient B: VitD-low und HPV⁻. Patient D: VitD-high und HPV⁻. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate der Patienten C und D zeigen stark gefärbte Zellinfiltrationen, was mikroskopisch mit einem höheren IR-Score bewertet wurde.

8.3.1. Abhängigkeit der MMP3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus

Auch hier wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um die Abhängigkeit der MMP3-Expression auf peritumoralen und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus zu untersuchen. Geprüft wurde, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) für MMP3⁺-Immunzellen je nach Vorhandensein des HP-Virus der HNSCC-Patienten unterscheiden. Auch hier wurden wieder zwei separate statistische Analysen (peritumoral und intratumoral) durchgeführt.

Die peritumorale Immunzellinfiltration konnte keinen Einfluss des HPV-Tumorstatus auf den IRS-Wert zeigen, was durch den statistisch nicht signifikanten p-Wert von $p = 0,8921$

bestätigt wird. In der peritumoralen Analyse betrug der Median des IRS bei den HPV⁺-Patienten (n = 21) und bei den HPV⁻-Patienten (n = 91) 1,5.

Die intratumorale Immunzellinfiltration hingegen zeigte eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines HP-Virus bei HNSCC-Patienten und niedrigeren IRS-Werten. Der p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests betrug für den intratumoralen Bereich $p = 0,0076$. In der intratumoralen Analyse betrug der Median des IRS der HPV⁺-Patienten (n = 21) 1 und der Median des IRS der HPV⁻-Patienten (n = 91) 2. Die statistische Auswertung der durch MMP3 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus wird in Abbildung 19 dargestellt.

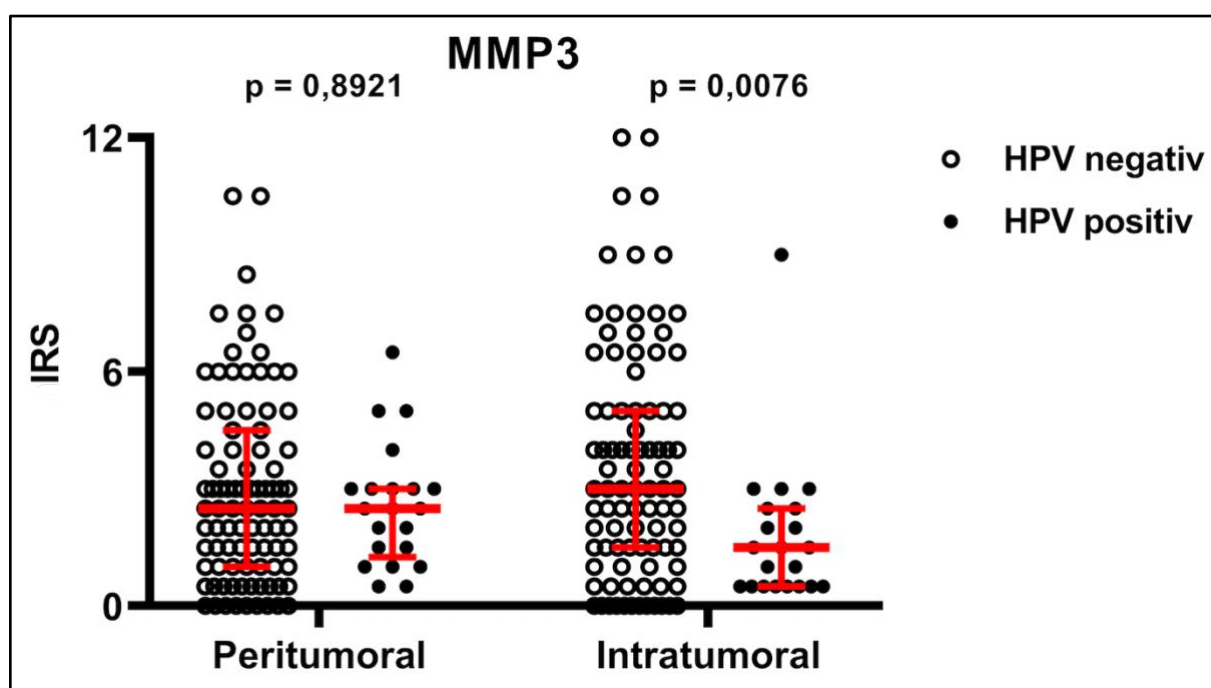


Abbildung 19: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der MMP3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 abgebildet. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die HPV⁺-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten Kreise stehen für die HPV⁻-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

In Abbildung 20 wird durch exemplarische Ausschnitte von gefärbten Gewebepräparaten zweier HNSCC-Patienten bildlich verdeutlicht, dass bei der intratumoralen Analyse ein negativer HPV-Tumorstatus zu einer stärkeren Infiltration durch MMP3⁺-Immunzellen führt (Bild A), während ein positiver HPV-Tumorstatus zu einer schwächeren Infiltration durch MMP3⁺-Immunzellen führt (Bild B).

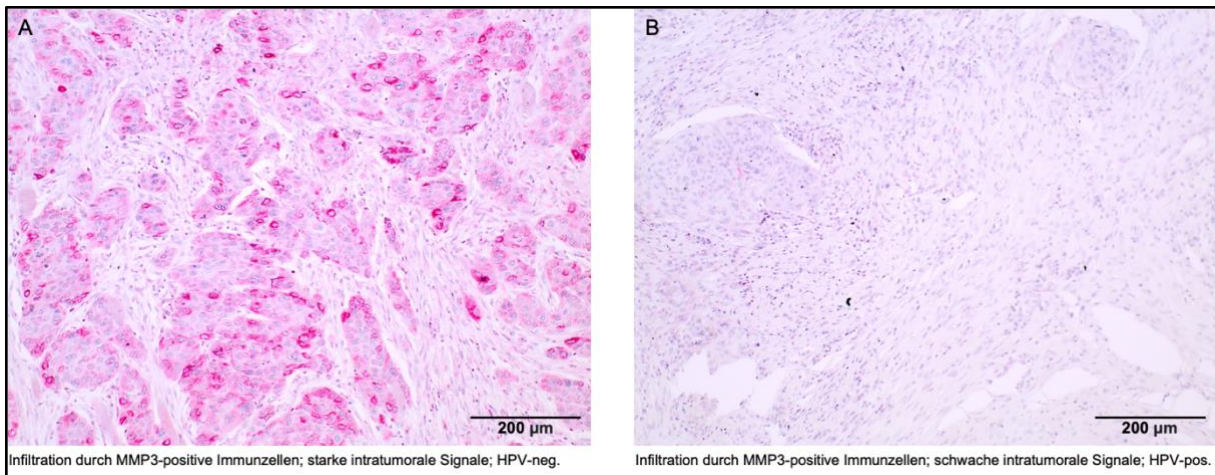


Abbildung 20: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch MMP3⁺-Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus. Bild A: HPV-HNSCC-Patient mit starker intratumoraler Immunezellinfiltration. Bild B: HPV⁺-HNSCC-Patient mit schwacher intratumoraler Immunezellinfiltration. 10x Vergrößerung.

8.3.2. Abhängigkeit der MMP3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status

Auch bei der statistischen Analyse des Vitamin D-Status wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) je nach Höhe der Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten unterscheiden. Wie bereits bei der Ergebnisdarstellung des Primärantikörpers IL-8, wurde auch hier das Patientenkollektiv dafür in zwei Gruppen eingeteilt abhängig von ihren Vitamin D-Serumwerten, die zuvor bestimmt wurden. Es wurde unterschieden zwischen einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten < 10ng/ml (VitD-low) und einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten ≥ 10ng/ml (VitD-high). Für die intra- und peritumoralen Immunzellen wurden separate statistische Analysen durchgeführt.

Es konnten mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (VitD-high vs. VitD-low), weder für die MMP3⁺ peritumoralen noch die MMP3⁺ intratumoralen Immunzellen nachgewiesen werden. Die p-Werte betragen $p = 0,8921$ (peritumoral) und $p = 0,2522$ (intratumoral). In der peritumoralen Analyse betrug der Median der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) und der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) 2,5. In der intratumoralen Analyse betrug der Median der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) 2, während der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) 3 betrug. Die statistische Auswertung der MMP3⁺-Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status wird in Abbildung 21 dargestellt.

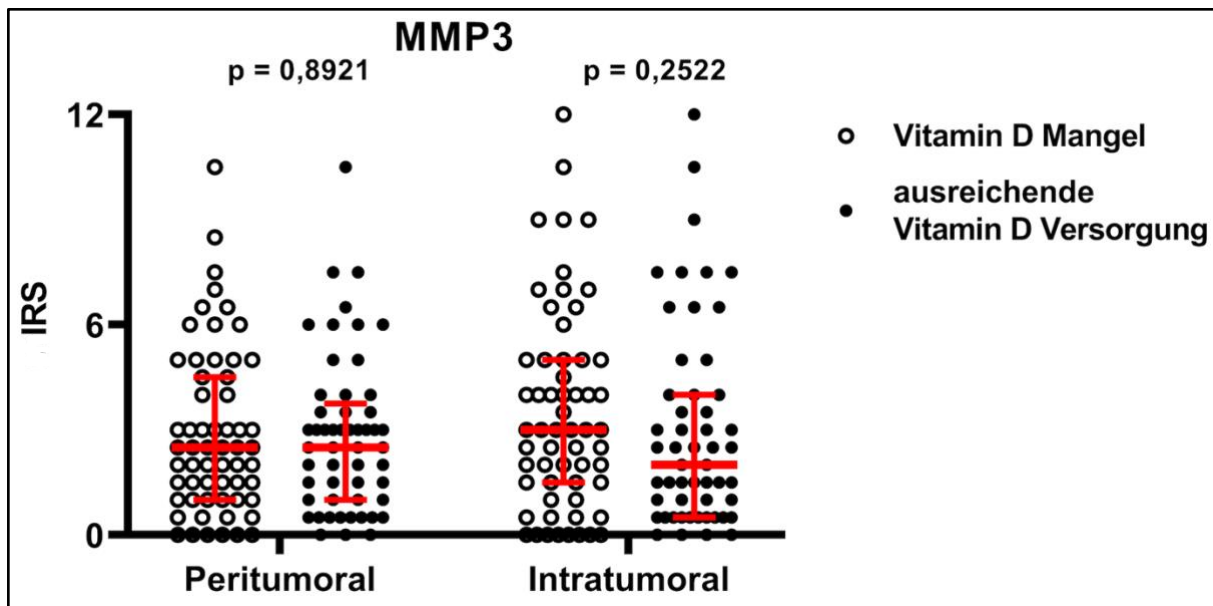


Abbildung 21: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der MMP3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 aufgetragen. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-high-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-low-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die folgende Abbildung 22 zeigt Ausschnitte zweier Gewebepreparate von HNSCC-Patienten, die zur VitD-low-Gruppe gehören und somit einen Vitamin-D-Serumwert $< 10\text{ng/ml}$ aufwiesen. Trotz der vergleichbaren Vitamin D-Serumspiegel zeigt das immunhistochemisch gefärbte Gewebepreparat des einen HNSCC-Patienten (A) eine schwache intratumorale Immunzellinfiltration und das des anderen HNSCC-Patienten (B) eine starke intratumorale Infiltration durch MMP3^+ -Immunzellen.

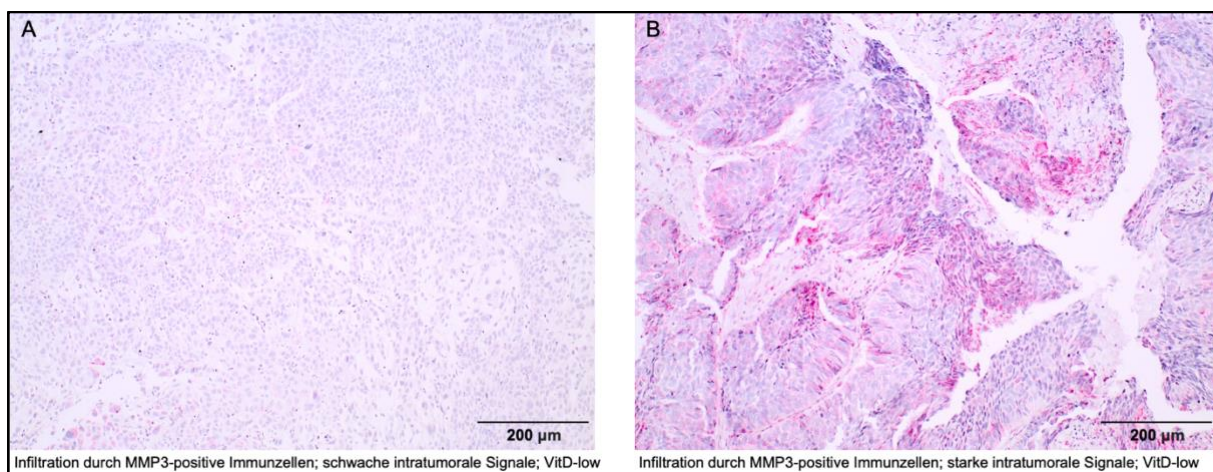


Abbildung 22: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch MMP3^+ -Immunzellen. In Bild A ist die MMP3 -Expression kaum und nur schwach sichtbar, während Bild B eine starke MMP3 -Expression der intratumoralen Immunzellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.3.3. Einfluss der MMP3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben

Die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs wurden mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) ausgewertet, wobei ein möglicher Zusammenhang zwischen der Infiltration mit MMP3⁺-Immunzellen mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht wurde. Dafür wurden die Patienten vorab einer low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und einer high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert) zugeordnet und diese beiden Gruppen verglichen. Auch hier wurde wie bei allen Analysen zuvor, der intratumorale Bereich im Präparat getrennt analysiert vom peritumoralen Bereich, sodass zwei separate Überlebensanalysen durchgeführt wurden. In der peritumoralen Analyse wurden 51 HNSCC-Patienten in der high-Expressionsgruppe und 65 HNSCC-Patienten in der low-Expressionsgruppe einsortiert und in der intratumoralen Analyse wurden 45 HNSCC-Patienten in der high-Expressionsgruppe und 71 HNSCC-Patienten in der low-Expressionsgruppe einsortiert. In den Abbildungen 23 und 24 werden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

In Abbildung 23 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die peritumorale Analyse dargestellt, die zeigt, dass Intensität und Menge der MMP3-Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten haben. Der p-Wert des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) betrug $p = 0,5205$ und der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests $p = 0,6239$. Somit konnte kein Unterschied zwischen der Low-Expressionsgruppe und der High-Expressionsgruppe im Gesamtüberleben gezeigt werden. Das mediane Überleben beider Gruppen konnten statistisch nicht erhoben werden, da die Überlebensraten nach der letzten Abfrage der Studienteilnehmer und somit dem Eintreffen des Ereignisses bei $> 50\%$ lagen („Median undefined“). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei der Low-Expressionsgruppe 1,2, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,81 betrug.

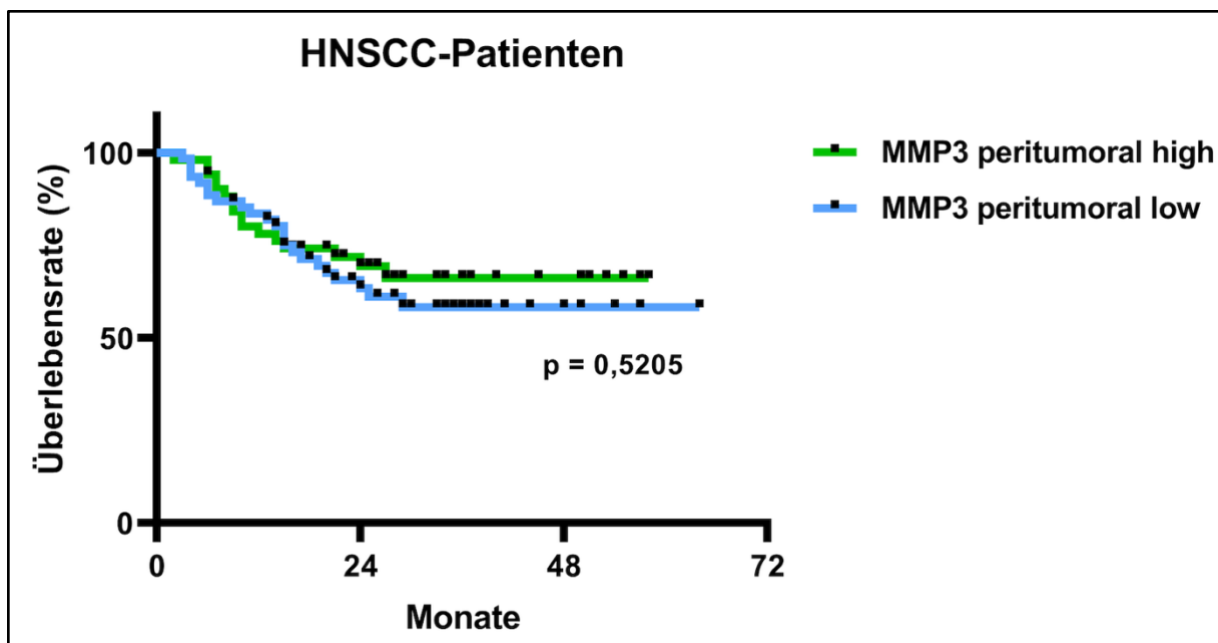


Abbildung 23: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der MMP3-Expression der peritumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der MMP3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die MMP3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,5205$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

In Abbildung 24 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die intratumorale Analyse dargestellt und auch hier kann mit einem p-Wert von $p = 0,7533$ des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) statistisch kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten bei einer starken MMP3-Expression im Vergleich zu einer schwachen MMP3-Expression gezeigt werden. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests betrug $p = 0,7315$. Auch hier konnte das mediane Überleben statistisch nicht errechnet werden. Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) lag bei der Low-Expressionsgruppe bei 0,9, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 1,11 betrug.

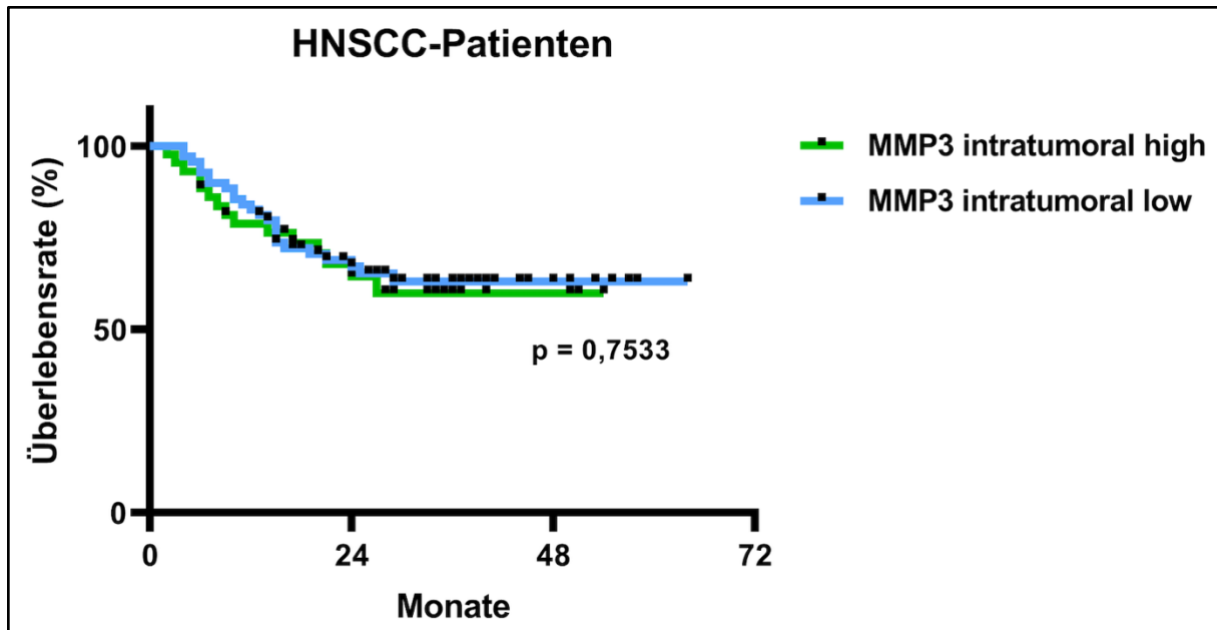


Abbildung 24: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der MMP3-Expression der intratumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der MMP3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die MMP3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,7533$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

8.4. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PD1

Auch für die Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PD1 wird zunächst eine Bilderreihe (Abbildung 25) mit gefärbten Gewebepräparaten dargestellt, die exemplarisch zeigen soll, welche Spannweite die immunhistochemischen Färbungen aufwiesen. Zu den Immunzellen, die durch den PD1-Primärantikörper detektiert werden, zählen unter anderem T-Zellen, Pro-B-Zellen und myeloischen Zellen und sie erscheinen in einem Magenta-Farbtönen. Die Plattenepithelkarzinome sind an der vom gesunden Epithel abweichenden morphologischen Struktur zu erkennen, welche sich in Form von Tumorzellinseln und Tumorzellsträngen darstellen lässt und ein Zeichen für invasives Wachstum darstellt.

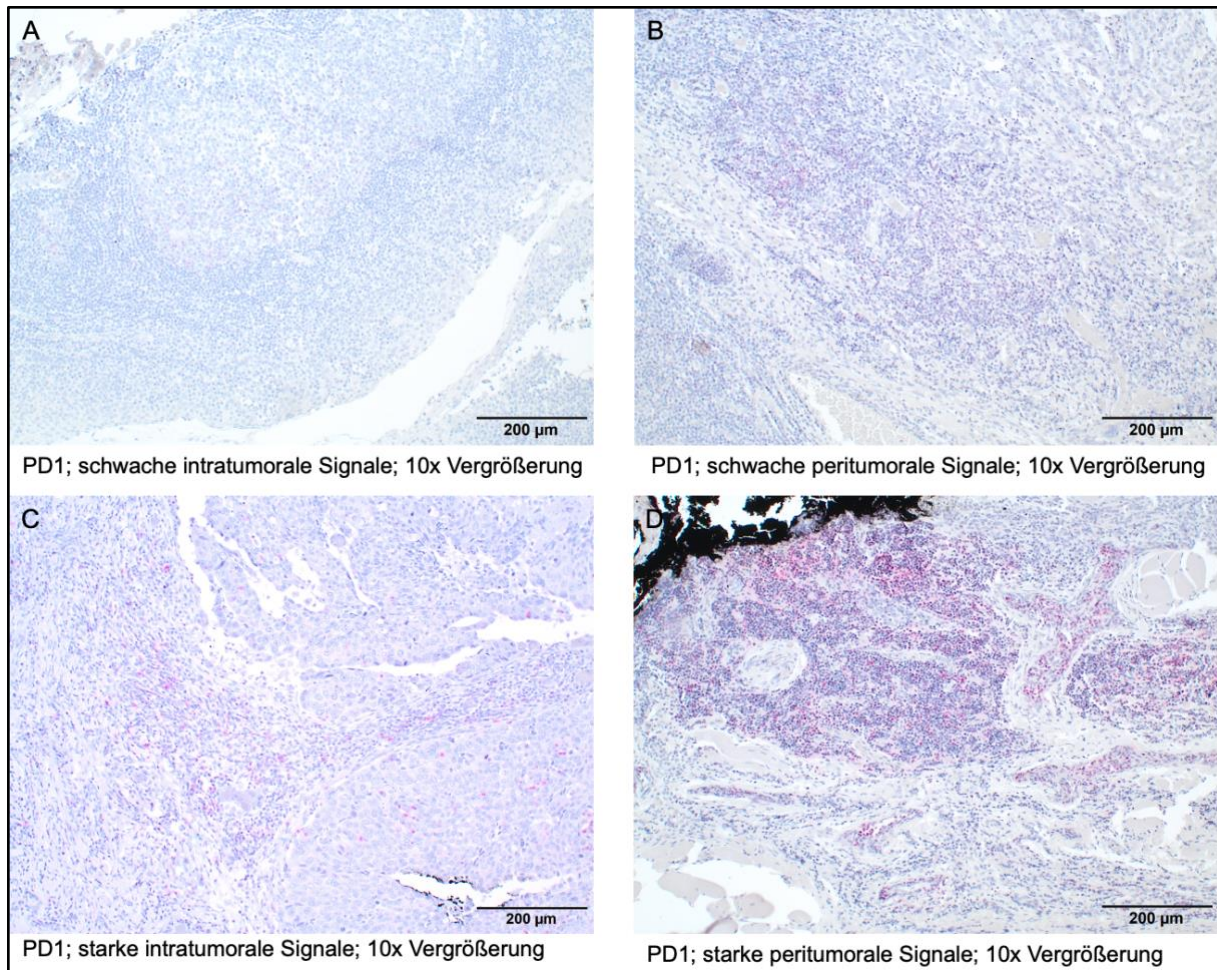


Abbildung 25: Exemplarische Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper PD1. Auf der linken Seite der Bilderreihe (A, C) werden die Immunzellinfiltrationen im intratumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient A: VitD-high und HPV⁺. Patient C: VitD-low und HPV⁻. Auf der rechten Seite der Bilderreihe (B, D) werden die Immunzellinfiltrationen im peritumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient B: VitD-high und HPV⁺. Patient D: VitD-high und HPV⁻. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate der Patienten C und D zeigen stark gefärbte Immunzellinfiltrationen, was mikroskopisch mit einem höheren IR-Score bewertet wurde.

8.4.1. Abhängigkeit der PD1-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus

Der Mann-Whitney-U-Test wurde genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die Immunzellinfiltration je nach Vorhandensein des HP-Virus der HNSCC-Patienten unterscheiden. Dies wurde je nachdem, wo sich die Immunzellinfiltration im Gewebepräparat befand, unterteilt in den Bereich um den Tumor (peritumoral) und der Lokalisation im Tumor (intratumoral), resultierend in zwei separaten statistischen Analysen.

Vor allem die peritumorale Immunzellinfiltration zeigte hierbei eine deutliche positive Korrelation zwischen einem positiven HPV-Tumorstatus und höheren IRS-Werten, was durch

den statistisch signifikanten p-Wert von $p = 0,0142$ bestätigt wird. In der peritumoralen Analyse beträgt der Median des IRS der HPV⁺-Patienten ($n = 21$) 0,5, während der Median der IRS der HPV⁻-Patienten ($n = 91$) 0 beträgt.

Auch bei der intratumoralen Immunzellinfiltration konnte eine positive Korrelation zwischen einem positiven HPV-Tumorstatus und höheren IRS-Werten gezeigt werden. Der p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests betrug für den intratumoralen Bereich $p = 0,0344$. In der intratumoralen Analyse betrug der Median des IRS der HPV⁺-Patienten ($n = 21$) 0 und der Median des IRS der HPV⁻-Patienten ($n = 91$) ebenfalls 0. Die statistische Auswertung der durch PD1 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus wird in Abbildung 26 dargestellt.

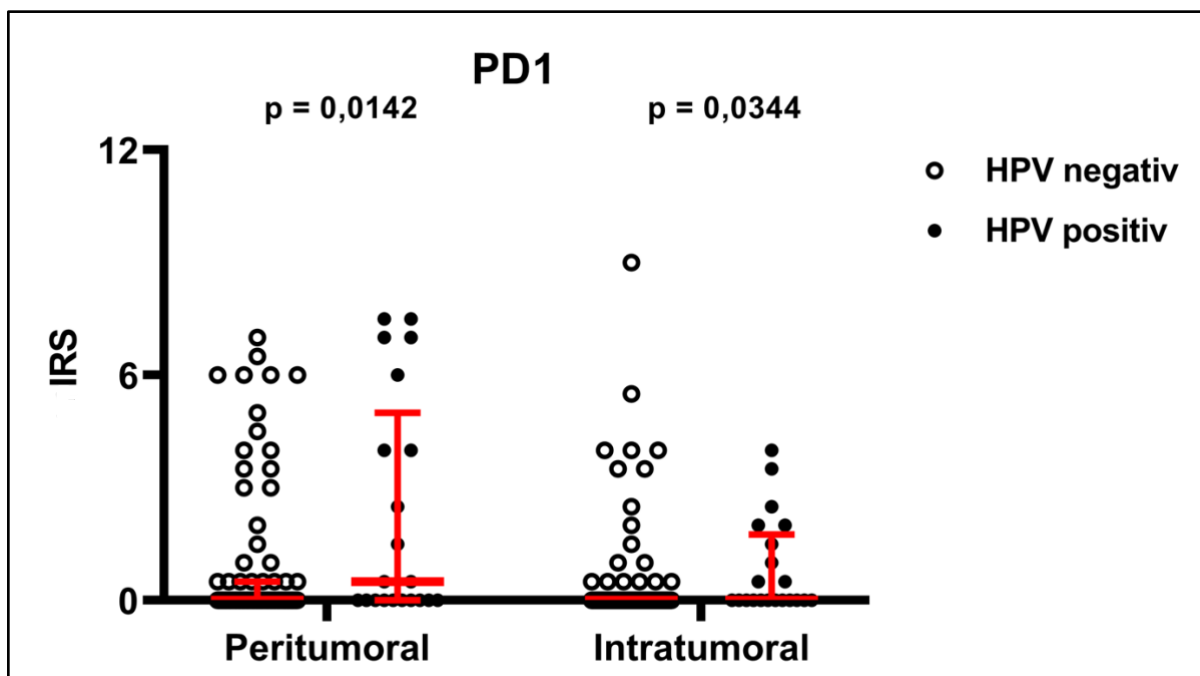


Abbildung 26: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der PD1-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 wiedergespiegelt. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die HPV⁺-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten Kreise stehen für die HPV⁻-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die Abbildung 27 zeigt exemplarisch Ausschnitte von immunhistochemisch gefärbten Gewebepreparaten zweier HNSCC-Patienten mit unterschiedlichem HPV-Tumorstatus. Während das gefärbte Präparat des Patienten mit negativem HPV-Tumorstatus nur eine schwache peritumorale Immunzellinfiltration durch PD1 zeigt (Bild A), imponieren beim HPV⁺-HNSCC-Patienten viele Immunzellen in einem kräftigen Magenta-Ton und repräsentieren eine starke Immunzellinfiltration durch PD1.

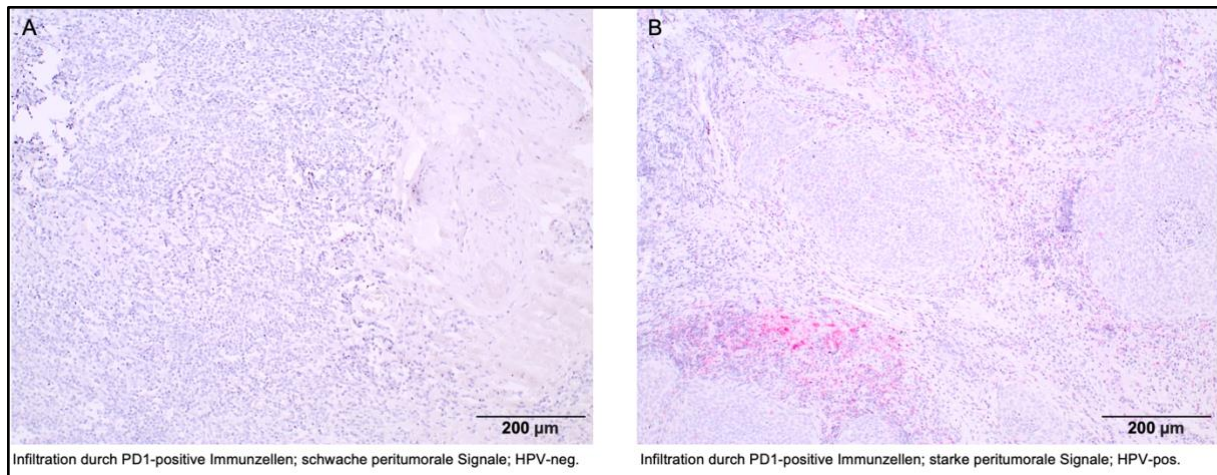


Abbildung 27: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC-Patienten mit peritumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus. Bild A: schwache peritumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen bei negativem HPV-Tumorstatus. Bild B: starke peritumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen bei positivem HPV-Tumorstatus. 10x Vergrößerung.

8.4.2. Abhängigkeit der PD1-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status

Auch bei der statistischen Analyse des Vitamin D-Status wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die Immunzellinfiltration je nach Höhe der Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten unterscheiden. Das Patientenkollektiv wurde dafür in zwei Gruppen eingeteilt, abhängig von ihren Vitamin D-Serumwerten, die zuvor bestimmt wurden. Es wurde unterschieden zwischen einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten < 10ng/ml (VitD-low) und einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten ≥ 10ng/ml (VitD-high). Für die intra- und peritumoralen Immunzellen wurden separate statistische Analysen durchgeführt.

Es konnten mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (VitD-high vs. VitD-low), weder für die PD1⁺ intratumoralen Immunzellen noch die PD1⁺ peritumoralen Immunzellen nachgewiesen werden. Die p-Werte betragen $p = 0,3900$ (peritumoral) und $p = 0,2644$ (intratumoral). In der Gruppe der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) betrug der Median 0 sowohl in der intratumoralen als auch in der peritumoralen Analyse und das gleiche zeigte sich beim Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$; Median = 0). Die statistische Auswertung der durch PD1 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status wird in Abbildung 28 dargestellt.

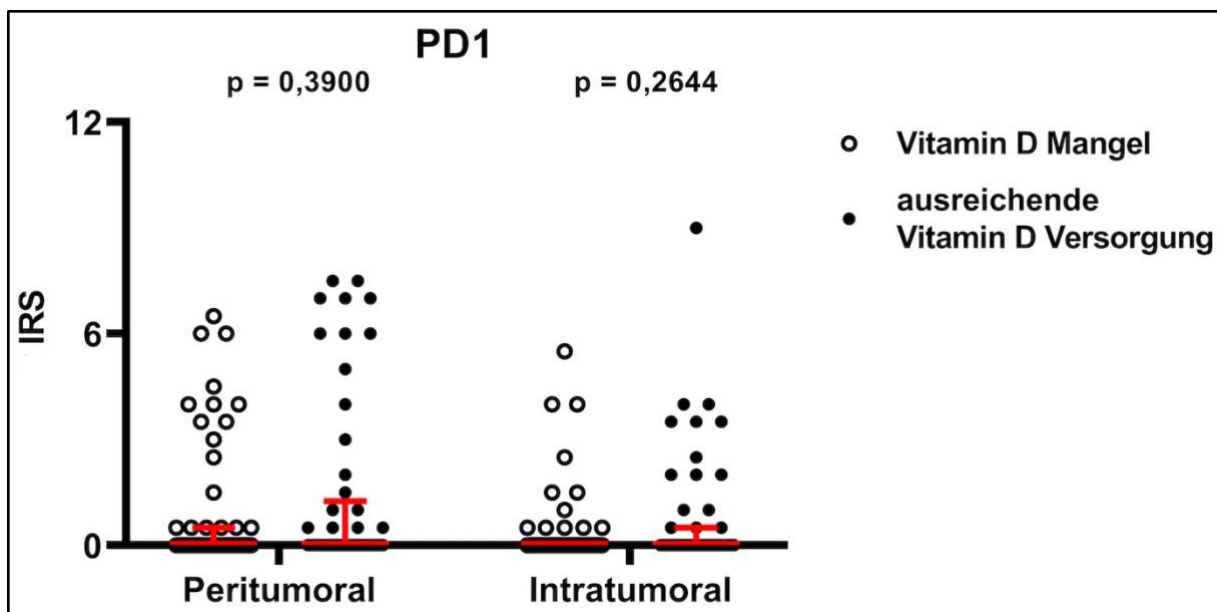


Abbildung 28: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der PD1-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 aufgetragen. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-high-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-low-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Verdeutlicht wird das Ergebnis durch die mikroskopischen Bilder in Abbildung 29, in der exemplarisch zu sehen ist, dass es trotz ähnlicher Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten (beide VitD-low) zu unterschiedlich starken Immunzellinfiltrationen durch den Primärantikörper PD1 kam. Bild A zeigt eine schwache intratumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen, während Bild B eine starke intratumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen zeigt.

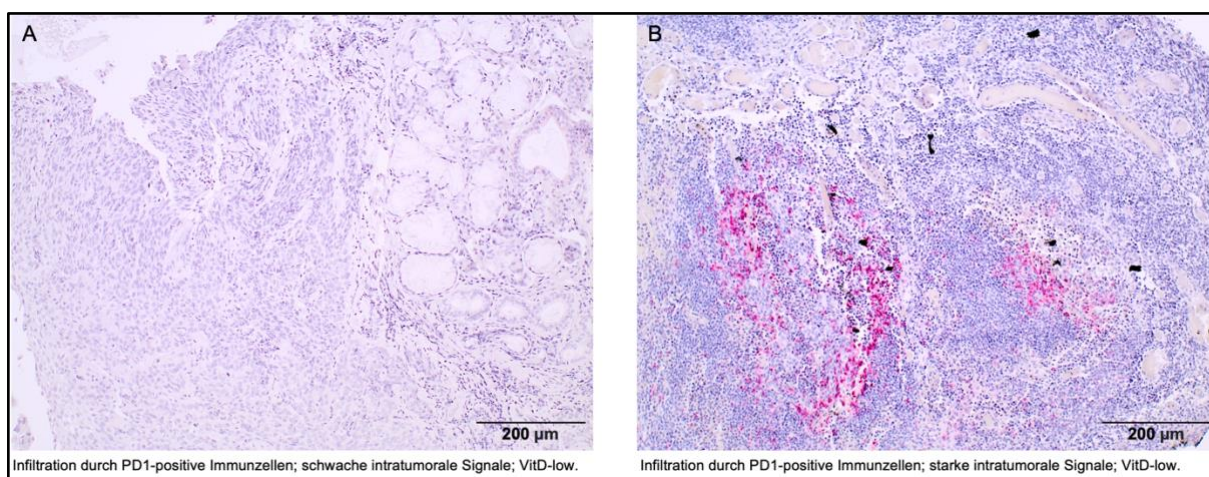


Abbildung 29: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-low-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen. Bild A: schwache intratumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen. Bild B: starke intratumorale Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen. 10x Vergrößerung.

8.4.3. Einfluss der PD1-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben

Die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs wurden mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) ausgewertet, wobei ein möglicher Zusammenhang zwischen der durch den Primärantikörper PD1 detektierten spezifischen Immunzellinfiltration (T-Zellen, Pro-B-Zellen, myeloische Zellen) mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht wurde. Dafür wurden die Patienten vorab einer low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und einer high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert) zugeordnet und beide Gruppen verglichen. Auch hier wurde, wie bei allen Analysen zuvor, der intratumorale Bereich im Präparat getrennt analysiert vom peritumoralen Bereich, sodass zwei separate Überlebensanalysen durchgeführt wurden. In der intratumoralen Analyse wurden 20 HNSCC-Patienten in der high-Expressionsgruppe und 96 HNSCC-Patienten in der low-Expressionsgruppe einsortiert und in der peritumoralen Analyse wurden 25 HNSCC-Patienten in der high-Expressionsgruppe und 91 HNSCC-Patienten in der low-Expressionsgruppe einsortiert. In den Abbildungen 30 und 31 werden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

In Abbildung 30 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die peritumorale Analyse dargestellt und hier beweist der Log-Rank-Test (Mantel-Cox) mit einem signifikanten p-Wert von $p = 0,0101$, dass eine höhere PD1-Expression der peritumoralen Immunzellen zu einem verbesserten Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten führt im Vergleich zu einer niedrigen PD1-Expression der peritumoralen Immunzellen. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests betrug 0,0159. Das mediane Überleben beider Gruppen konnte statistisch nicht erhoben werden, da die Überlebensraten nach der letzten Abfrage der Studienteilnehmer und somit dem Eintreffen des Ereignisses bei $> 50\%$ lagen („Median undefined“). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) lag bei der Low-Expressionsgruppe bei 2,6, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,39 betrug.

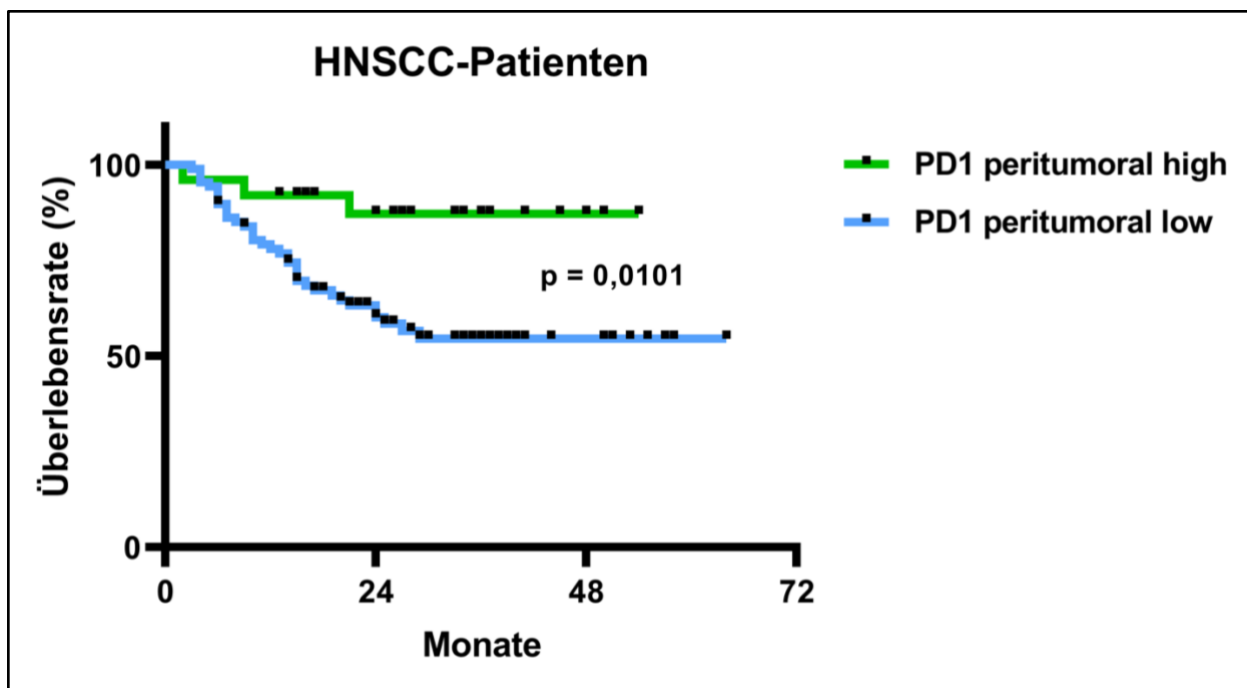


Abbildung 30: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der PD1-Expression der peritumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der PD1-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die PD1-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,0101$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

In Abbildung 31 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die intratumorale Analyse dargestellt, die zeigt, dass eine hohe PD1-Expression der intratumoralen Immunzellen zu einem besseren Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten führt verglichen mit einer niedrigeren PD1-Expression der intratumoralen Immunzellen. Der p-Wert des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) betrug $p = 0,0266$ und der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests $p = 0,0480$. Auch hier konnten die Mediane statistisch nicht errechnet werden. Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei der Low-Expressionsgruppe 2,5, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,4 betrug.

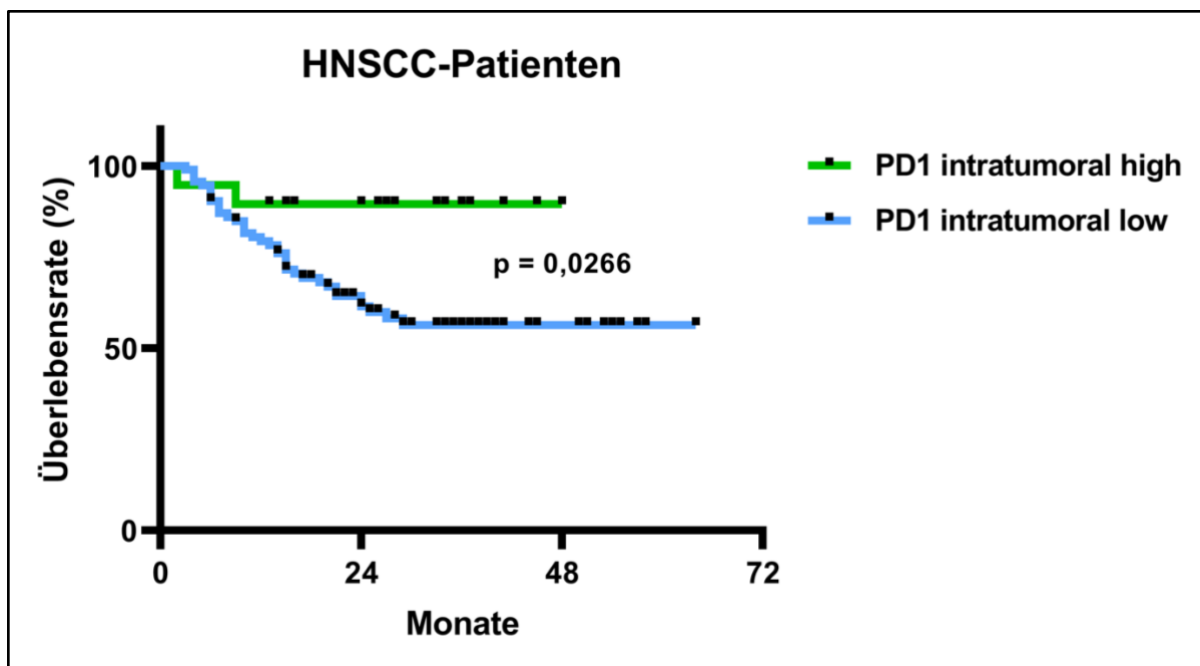


Abbildung 31: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der PD1-Expression der intratumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der PD1-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die PD1-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,0266$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

8.5. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von TIM 3

Um die Spannweite der immunhistochemischen Färbungen exemplarisch zu zeigen, wird auch hier zunächst eine Bilderreihe (Abbildung 32) mit Gewebepräparaten der immunhistochemisch mit TIM 3 gefärbten Gewebeproben von HNSCC-Patienten gezeigt. Der Primärantikörper TIM 3 detektiert spezifische Immunzellen, wie unter anderem $CD4^+$ -T-Helferzellen, $CD8^+$ -T-Killerzellen, TH17-Zellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und Makrophagen. Die detektierten Immunzellen erscheinen in einem Magenta-Farbtönen und lassen sich von den Plattenepithelkarzinomen nicht nur durch die Färbung unterscheiden, sondern auch durch ihre morphologische Struktur. Das Plattenepithelkarzinom zeichnet sich durch Tumorzellinseln und Tumorzellstränge aus und dies ist gleichzeitig ein Zeichen für invasives Wachstum.

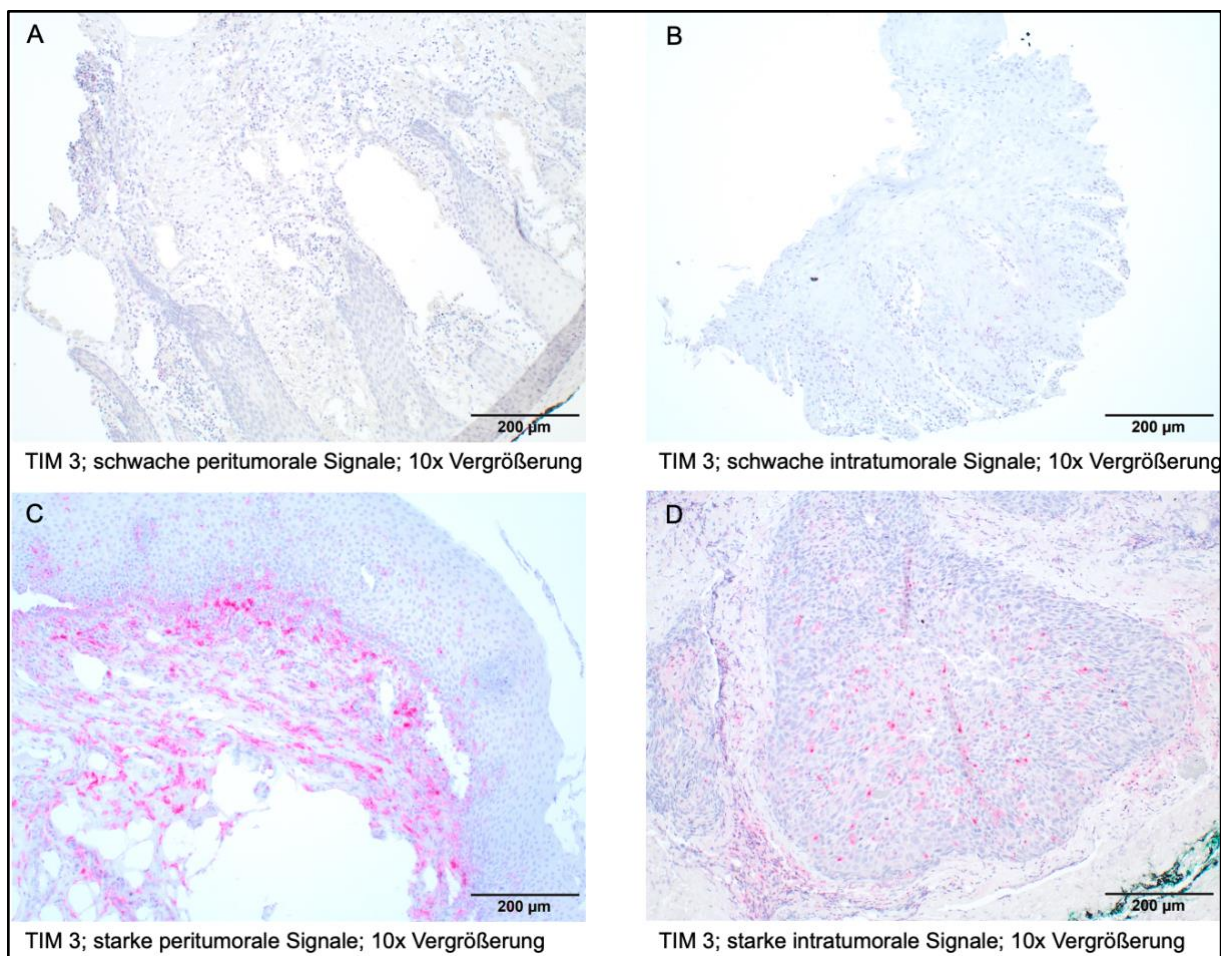


Abbildung 32: Exemplarische Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper TIM 3. Auf der linken Seite der Bilderreihe (A, C) werden die Immunezellinfiltrationen im peritumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient A: VitD-low und HPV-. Patient C: VitD-low und HPV+. Auf der rechten Seite der Bilderreihe (B, D) werden die Immunezellinfiltrationen im intratumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient B: VitD-high und HPV-. Patient D: VitD-low und HPV+. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate der Patienten C und D zeigen starke Immunezellinfiltrationen, was mikroskopisch mit einem höheren IR-Score bewertet wurde.

8.5.1. Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunezellen vom HPV-Tumorstatus

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die TIM 3⁺-Immunezellinfiltration je nach Vorhandensein des HP-Virus der HNSCC-Patienten unterscheiden. Es wurden zwei separate statistische Analysen durchgeführt, je nachdem, wo sich die Immunezellinfiltration im Gewebepräparat befand (peritumoral und intratumoral).

Sowohl die peritumorale als auch die intratumorale Immunezellinfiltration zeigte eine deutliche positive Korrelation zwischen einem positiven HPV-Tumorstatus und höheren IRS-Werten, was durch die statistisch signifikanten p-Werte von $p = 0,0180$ (peritumoral) und $p = 0,0315$

(intratumoral) bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestätigt wurde. In der peritumoralen Analyse betrug der Median des IRS der HPV⁺-Patienten (n = 21) 6, während der Median des IRS der HPV⁻-Patienten (n = 91) 3,5 betrug. Die Differenz dieser beiden Mediane liegt bei 2,5, was die Deutlichkeit der unterschiedlichen Färbeergebnisse und die Abhängigkeit der IRS-Werte vom HPV-Tumorstatus unterstreicht. In der intratumoralen Analyse betrug der Median des IRS der HPV⁺-Patienten (n = 21) 4 und der Median des IRS der HPV⁻-Patienten (n = 91) 2,5. Die statistische Auswertung der durch TIM 3 detektierten Immuneinfiltration in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus wird in Abbildung 33 dargestellt.

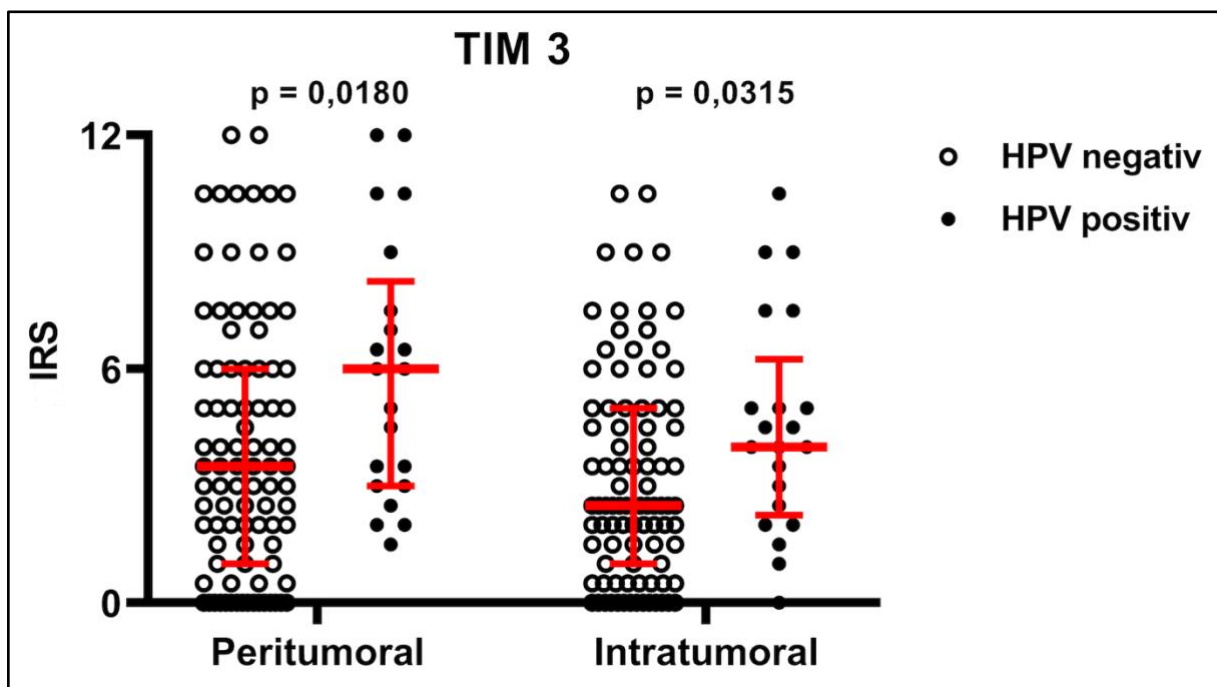


Abbildung 33: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 wiederspiegelt. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die HPV⁺-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten Kreise stehen für die HPV⁻-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die p-Werte beider separaten Analysen liegen mit $p = 0,0180$ (peritumoral) und $p = 0,0315$ (intratumoral) unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die Abbildung 34 zeigt exemplarisch Ausschnitte von immunhistochemisch gefärbten Gewebepreparaten zweier HNSCC-Patienten mit negativem beziehungsweise positivem HPV-Tumorstatus. Während das immunhistochemisch gefärbte Präparat des Patienten mit negativem HPV-Tumorstatus nur eine schwache peritumorale Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen zeigt (Bild A), imponieren beim HPV⁺-HNSCC-Patienten viele Immunzellen in einem kräftigen Magenta-Ton und repräsentieren eine starke peritumorale Immuneinfiltration durch TIM 3.

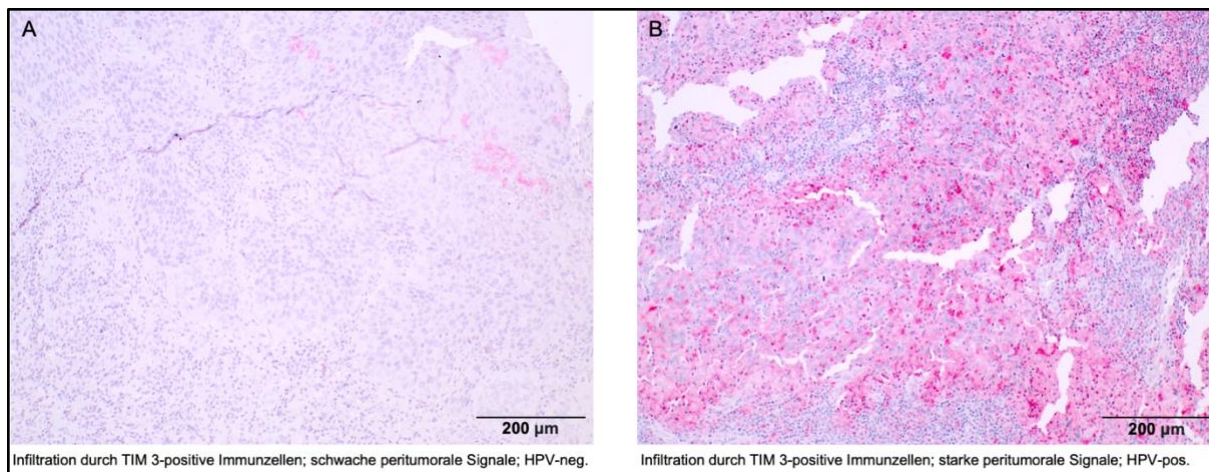


Abbildung 34: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HNSCC-Patienten mit peritumorale Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen bei unterschiedlichem HPV-Tumorstatus. Bild A: schwache peritumorale Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen bei negativem HPV-Tumorstatus. Bild B: starke peritumorale Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen bei positivem HPV-Tumorstatus. 10x Vergrößerung.

8.5.2. Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status

Der Mann-Whitney-U-Test wurde genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die TIM 3⁺-Immunzellinfiltration je nach Höhe der Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten unterscheiden. Wie in den bisher beschriebenen Ergebnisteilen wurde auch hier das Patientenkollektiv in zwei Gruppen eingeteilt abhängig von ihren Vitamin D-Serumwerten, die zuvor bestimmt wurden. Mit Vitamin D-Serumwerten < 10ng/ml wurden die HNSCC-Patienten in die VitD-low-Gruppe eingeteilt und mit Vitamin D-Serumwerten ≥ 10ng/ml wurden die HNSCC-Patienten in die VitD-high-Gruppe eingeteilt. Für die intra- und peritumoralen Immunzellen wurden separate statistische Analysen durchgeführt.

Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnten weder für die TIM 3⁺-peritumoralen Immunzellen noch für die TIM 3⁺-intratumoralen Immunzellen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (VitD-high vs. VitD-low) nachgewiesen werden. Die p-Werte betragen $p = 0,5057$ (peritumoral) und $p = 0,3192$ (intratumoral). In der peritumoralen Analyse betrug der Median sowohl in der Gruppe der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) 3,5 als auch in der Gruppe der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$; Median 3,5). In der intratumoralen Analyse lag der Median bei den VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) bei 3, während der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) mit einem Wert von 2,5 leicht vermindert war. In Abbildung 35 wird die statistische Auswertung der durch TIM 3 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status dargestellt.

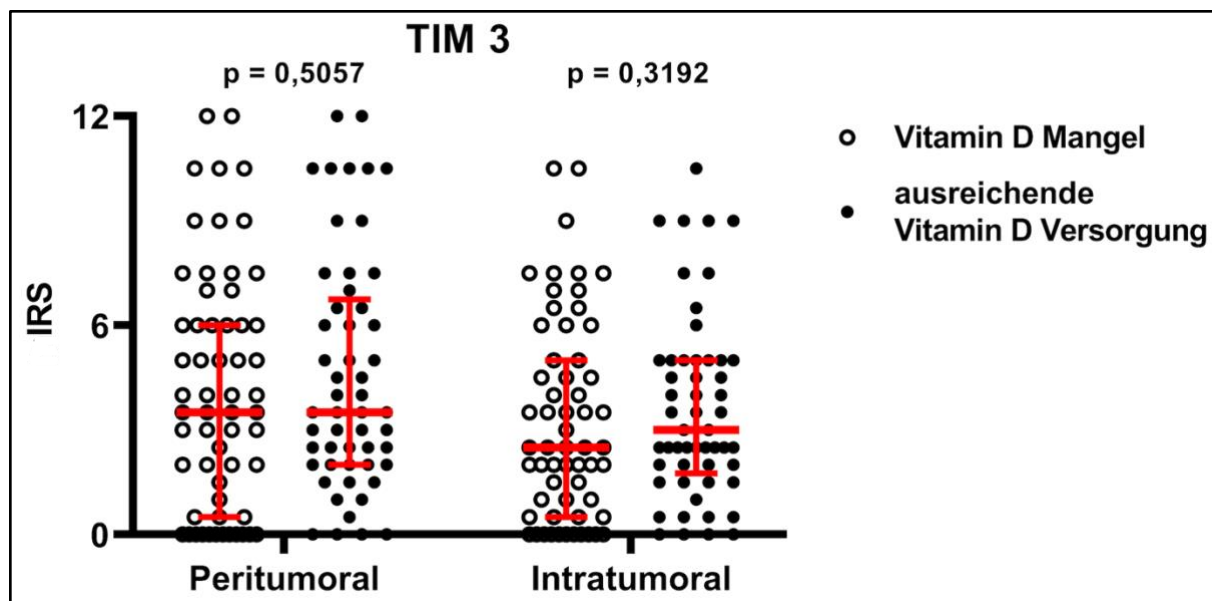


Abbildung 35: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der TIM 3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 aufgetragen. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-high-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-low-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

In der Abbildung 36 wird das Ergebnis durch mikroskopische Bilder verdeutlicht. Die Gewebeschnitte beider HNSCC-Patienten gehören der VitD-high-Gruppe an und in Bild A zeigen wenige Immunzellen eine zudem schwache TIM 3-Expression, während in Bild B viele Immunzellen stark angefärbt sind, was für eine deutliche Infiltration durch TIM 3⁺ Immunzellen spricht. Trotz des gleichen Vitamin D-Status konnten unterschiedlich ausgeprägte Immunzellinfiltrationen mit zudem unterschiedlich starker TIM 3-Expressionen nachgewiesen werden.

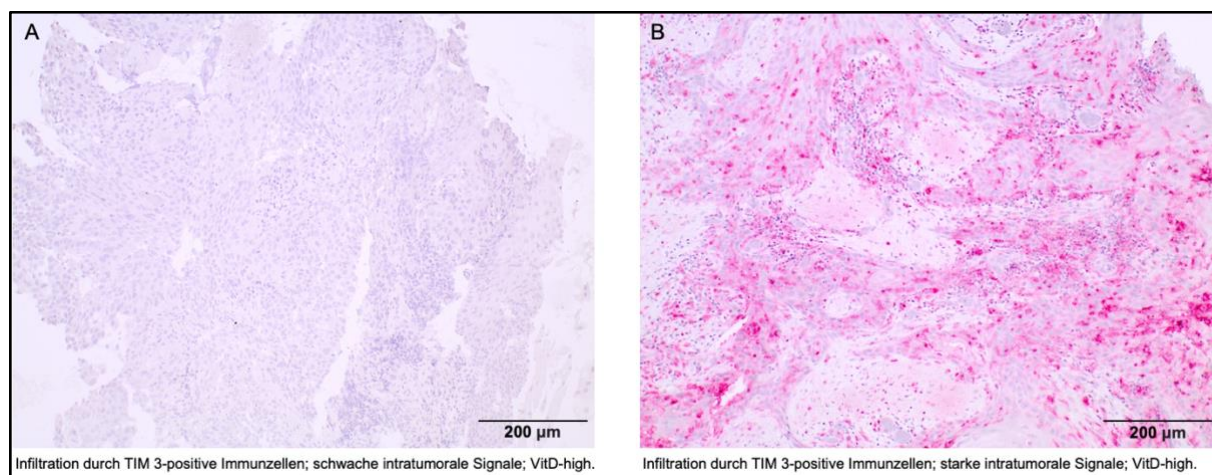


Abbildung 36: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-high-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen. Bild A zeigt eine schwache intratumorale Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen, während Bild B eine starke Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.5.3. Einfluss der TIM 3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben

Mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) wurden die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs ausgewertet, wobei ein möglicher Zusammenhang zwischen der durch den Primärantikörper TIM 3 detektierten spezifischen Immunzellinfiltration (CD4⁺-T-Helferzellen, CD8⁺-T-Killerzellen, TH17-Zellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, Makrophagen) mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht wurde. Analog zu den bereits zuvor beschriebenen Biomarkern wurden auch für diese Analyse die Patienten vorab einer low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und einer high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert) zugeordnet und beide Gruppen verglichen. Auch hier wurden zwei separate Analysen (peritumoral und intratumoral) durchgeführt und beide Bereiche im Gewebepreparat getrennt analysiert. In der peritumoralen Analyse wurden 49 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 67 HNSCC-Patienten der low-Expressionsgruppe zugeordnet, in der intratumoralen Analyse wurden 53 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 63 HNSCC-Patienten der low-Expressionsgruppe zugeordnet. In den Abbildungen 37 und 38 werden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

Die peritumorale Analyse der Überlebenskurve nach Kaplan-Meier wird in Abbildung 37 dargestellt. Ein p-Wert von $p < 0,001$ zeigte bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, dass eine hohe TIM 3-Expression der peritumoralen Immunzellen statistisch signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert, verglichen mit einer niedrigen TIM 3-Expression der peritumoralen Immunzellen. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests lag ebenfalls bei $p < 0,001$. Das mediane Überleben der low-Expressionsgruppe konnte mit 27 Monaten ermittelt werden, während das mediane Überleben der high-Expressionsgruppe statistisch nicht erhoben werden konnte, da die Überlebensraten nach der letzten Abfrage der Studienteilnehmer und somit dem Eintreffen des Ereignisses bei $> 50\%$ lagen („Median undefined“). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei der Low-Expressionsgruppe 3,6, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,3 betrug.

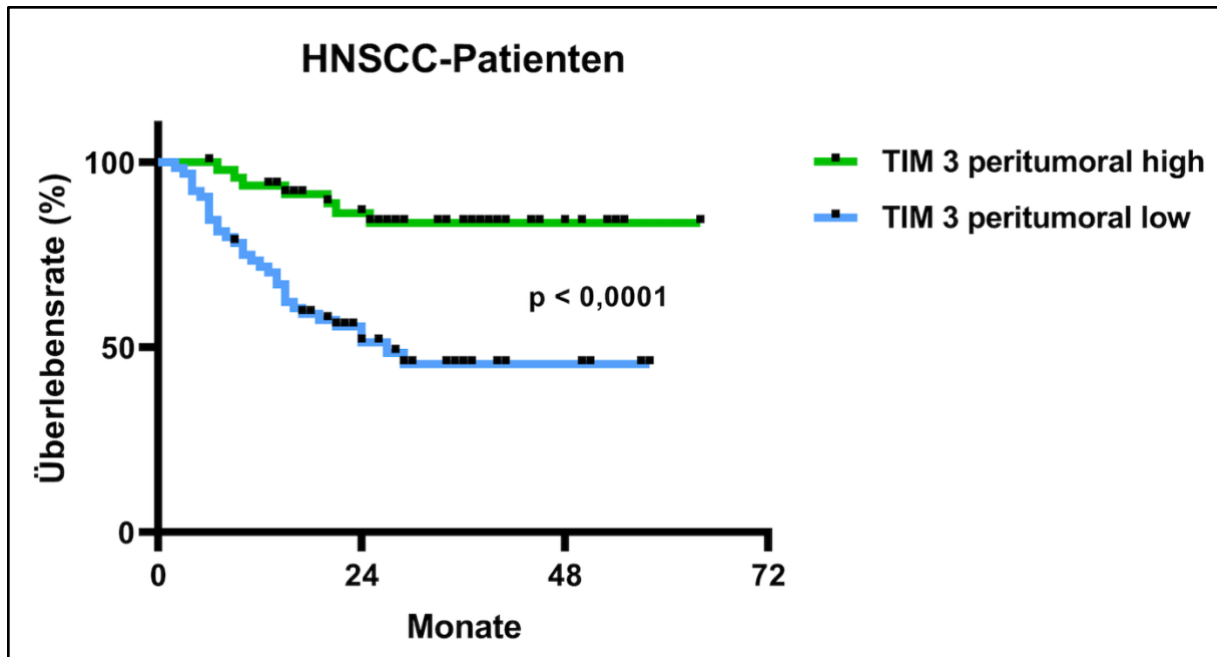


Abbildung 37: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der TIM 3-Expression der peritumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der TIM 3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die TIM 3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p < 0,0001$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant. Das mediane Überleben der low-Expressionsgruppe liegt bei 27 Monaten. Das mediane Überleben der high-Expressionsgruppe konnte statistisch nicht erhoben werden („Median undefined“). Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die intratumorale Analyse wird in Abbildung 38 dargestellt und auch hier beweist der Log-Rank-Test (Mantel-Cox) mit einem signifikanten p-Wert von $p = 0,0280$, dass eine höhere TIM 3-Expression der intratumoralen Immunzellen mit einem verbesserten Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert im Vergleich zu einer niedrigen TIM 3-Expression der intratumoralen Immunzellen. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests betrug 0,0401. Das mediane Überleben konnte in der intratumoralen Analyse weder bei der low-Expressionsgruppe noch bei der high-Expressionsgruppe statistisch ermittelt werden. Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) lag bei der low-Expressionsgruppe bei 2,0, während die Hazard Ratio bei der high-Expressionsgruppe 0,5 betrug.

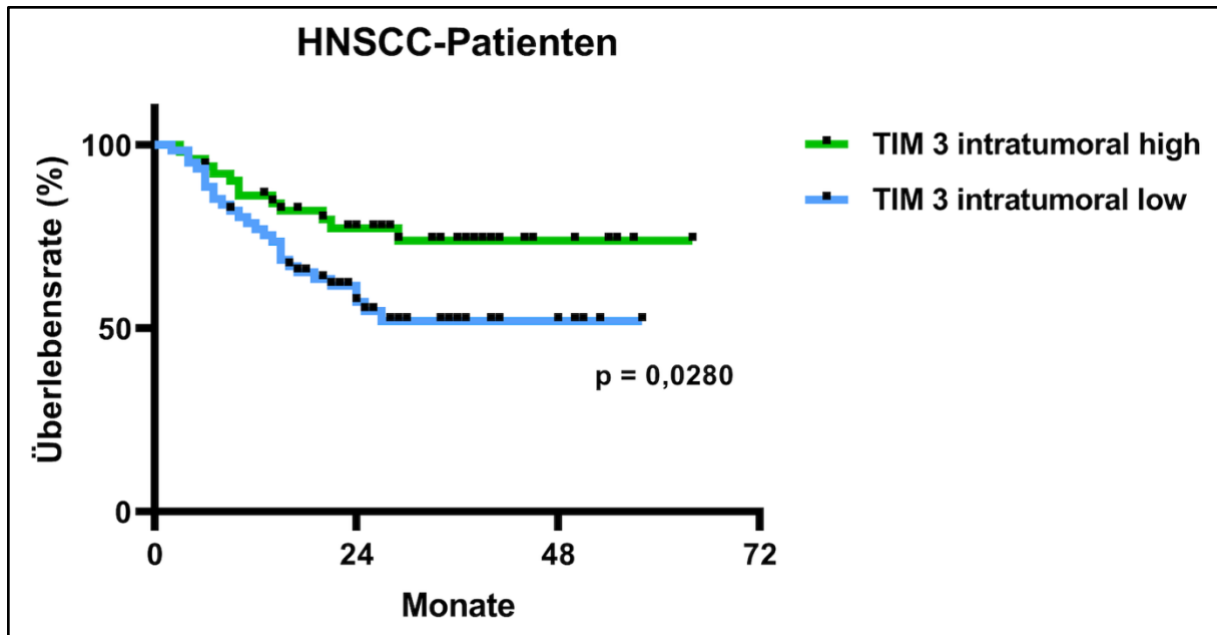


Abbildung 38: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der TIM 3-Expression der intratumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der TIM 3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die TIM 3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,0280$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

8.6. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von LAG-3

Die folgende Bilderreihe (Abbildung 39) der immunhistochemisch gefärbten Gewebepräparaten mit dem Primärantikörper LAG-3 soll auch hier die Spannweite der Färbungen exemplarisch zeigen. In einem Magenta-Farbton erscheinen die Immunzellen, die durch den LAG-3-Primärantikörper detektiert werden, wozu unter anderem T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und dendritische Zellen zählen. Die Plattenepithelkarzinome sind an der vom gesunden Epithel abweichenden morphologischen Struktur zu erkennen, welche sich in Form von Tumorzellinseln und Tumorzellsträngen darstellen lässt und ein Zeichen für invasives Wachstum darstellt.

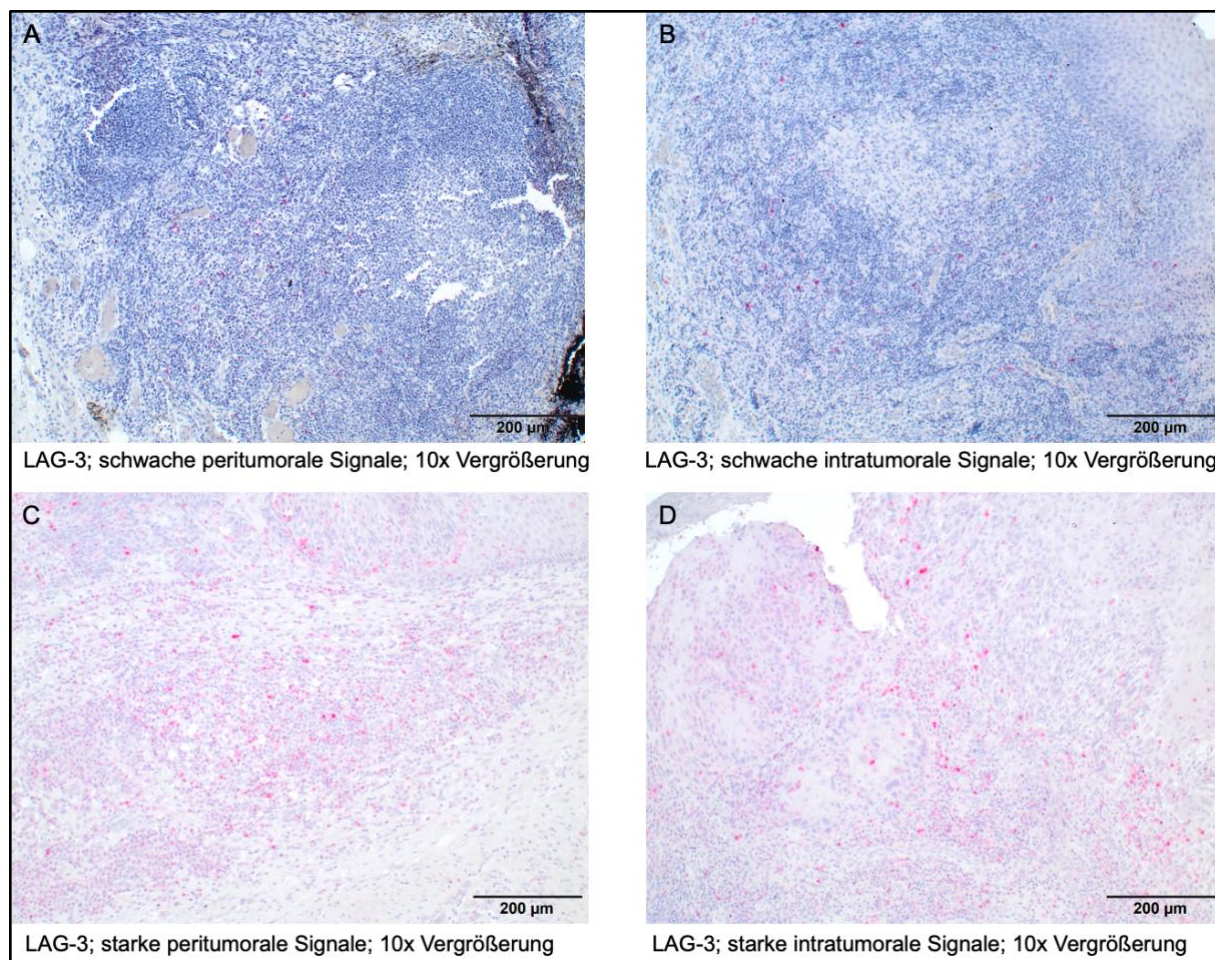


Abbildung 39: Exemplarische Bilderreihe der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper LAG-3. Auf der linken Seite der Bilderreihe (A, C) werden die Immunzellinfiltrationen im peritumoralem Bereich des Präparats dargestellt. Patient A: VitD-low und HPV⁻. Patient C: VitD-low und HPV⁻. Auf der rechten Seite der Bilderreihe (B, D) werden die Immunzellinfiltrationen im intratumoralen Bereich des Präparats dargestellt. Patient B: VitD-low und HPV⁻. Patient D: VitD-low und HPV⁻. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate der Patienten C und D zeigen stark gefärbte Immunzellinfiltrationen, was mikroskopisch mit höheren IR-Scores bewertet wurde.

8.6.1. Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus

Auch hier wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die Immunzellinfiltration je nach Vorhandensein des HP-Virus der HNSCC-Patienten unterscheiden. Dies wurde je nachdem, wo sich die Immunzellinfiltration im Gewebepräparat befand, unterteilt in den Bereich um den Tumor (peritumoral) und der Lokalisation im Tumor (intratumoral), resultierend in zwei separaten statistischen Analysen.

Die peritumoralen und intratumoralen Immunzellinfiltrationen zeigten keine positiven Korrelationen zwischen einem positiven HPV-Tumorstatus und höheren IRS-Werten, was

durch die statistisch nicht signifikanten p-Werte von $p = 0,2128$ (peritumoral) und $p = 0,1239$ (intratumoral) bestätigt wird. Es gab 21 HPV⁺-HNSCC-Patienten ($n = 21$) und 91 HPV⁻-HNSCC-Patienten ($n = 91$). Sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Analyse betrug der Median der HPV⁺-HNSCC-Patienten 2, während in beiden Analysen (peritumoral und intratumoral) der Median der HPV⁻-HNSCC-Patienten 1 betrug. Die statistische Auswertung der durch LAG-3 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom HPV-Tumorstatus wird in Abbildung 40 dargestellt.

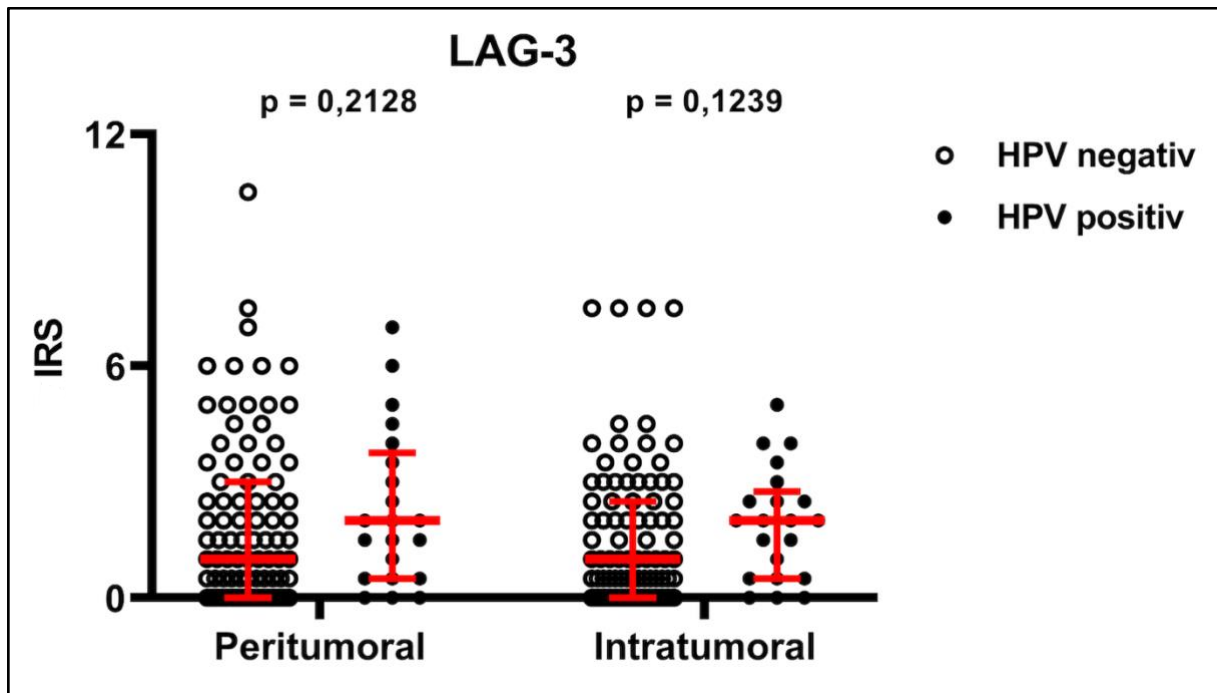


Abbildung 40: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom HPV-Tumorstatus. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 widerspiegelt. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die HPV⁺-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten Kreise stehen für die HPV⁻-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die Abbildung 41 zeigt exemplarisch Ausschnitte zweier Gewebepräparate, in der die intratumorale Immunzellinfiltration zweier HPV⁻-HNSCC-Patienten abgebildet wird. Trotz des gleichen HPV-Tumorstatus (beide HPV⁻) zeigt sich bei Patient A eine schwache intratumorale Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen, während bei Patient B viele intratumorale Immunzellen eine zudem starke LAG-3-Expression zeigen.

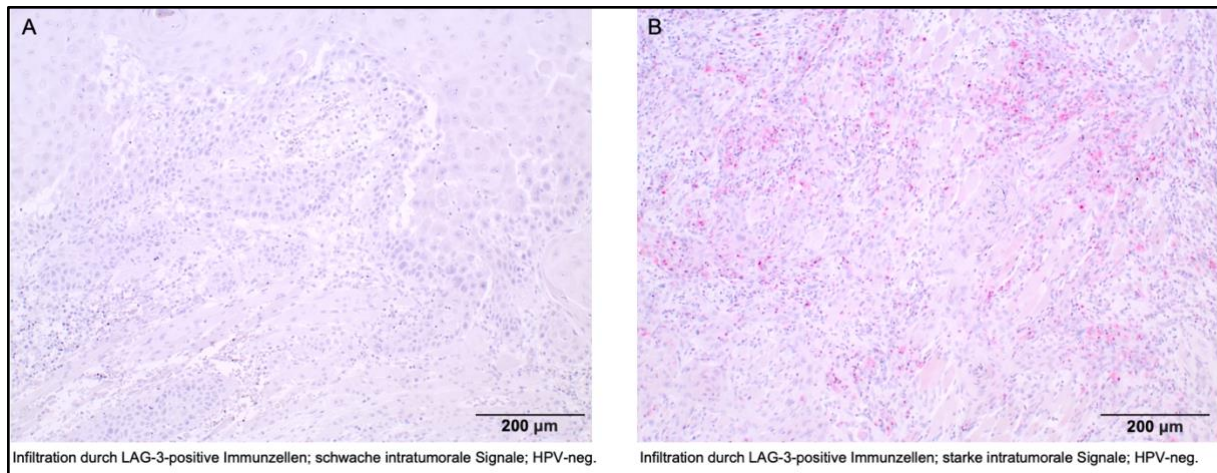


Abbildung 41: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von HPV-HNSCC-Patienten mit intratumoraler Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen. In Bild A ist die LAG-3-Expression kaum und nur schwach sichtbar, während Bild B eine starke Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.6.2. Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf intra- und peritumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status

Auch bei der statistischen Analyse des Vitamin D-Status wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um zu überprüfen, ob sich die Werte des immunreaktiven Scores (IRS) und somit die LAG-3-Expression der Immunzellinfiltration je nach Höhe der Vitamin D-Serumwerte der HNSCC-Patienten unterscheiden. Das Patientenkollektiv wurde dafür in zwei Gruppen eingeteilt abhängig von ihren Vitamin D-Serumwerten, die zuvor bestimmt wurden. Es wurde unterschieden zwischen einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten < 10ng/ml (VitD-low) und einer Patientengruppe mit Vitamin D-Serumwerten ≥ 10ng/ml (VitD-high). Für die intra- und peritumoralen Immunzellen wurden separate statistische Analysen durchgeführt.

Es konnten mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (VitD-high vs. VitD-low), weder für die LAG-3⁺-peritumoralen Immunzellen noch die LAG-3⁺-intratumoralen Immunzellen nachgewiesen werden. Die p-Werte betragen $p = 0,8382$ (peritumoral) und $p = 0,7426$ (intratumoral). In der peritumoralen Analyse betrug der Median der VitD-high-HNSCC-Patienten ($n = 53$) 1 und der Median der VitD-low-HNSCC-Patienten ($n = 59$) 1,5. In der intratumoralen Analyse betrug die Mediane beider Gruppen (VitD-high mit $n = 53$ und VitD-low mit $n = 59$) 1. Die statistische Auswertung der durch LAG-3 detektierten Immunzellinfiltration in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status wird in Abbildung 42 dargestellt.

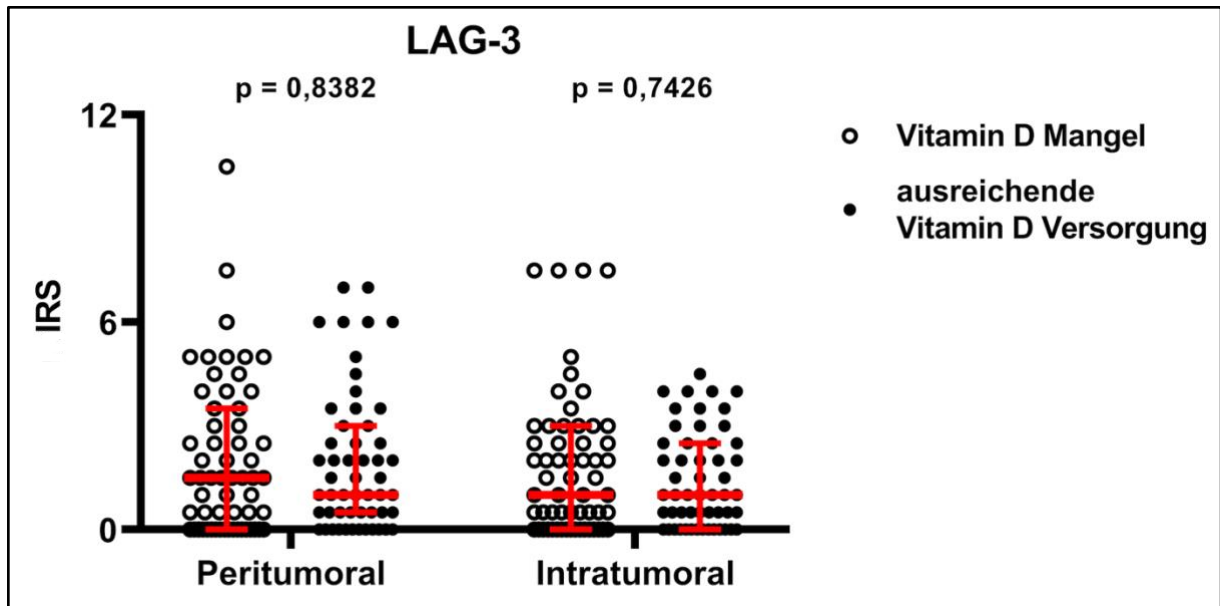


Abbildung 42: Statistische Auswertung der Abhängigkeit der LAG-3-Expression auf peri- und intratumoralen Immunzellen vom Vitamin D-Status. Auf der y-Achse wird der IR-Score mit Werten zwischen 0-12 aufgetragen. Die ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-high-HNSCC-Patienten und die nicht ausgefüllten schwarzen Kreise stehen für die VitD-low-HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs. Die roten Linien des Scatter-Blots repräsentieren den Median sowie die Standardabweichungen.

Die folgende Abbildung 43 zeigt Ausschnitte von immunhistochemisch gefärbten Gewebepräparaten zweier HNSCC-Patienten, die zu der VitD-high-Gruppe gehören und somit einen Vitamin D-Serumwert $\geq 10\text{ng/ml}$ aufwiesen. Trotz gleicher Vitamin D-Serumwerte zeigen die Immunzellen bei Patient A eine schwache LAG-3-Expression und bei Patient B eine starke LAG-3-Expression.

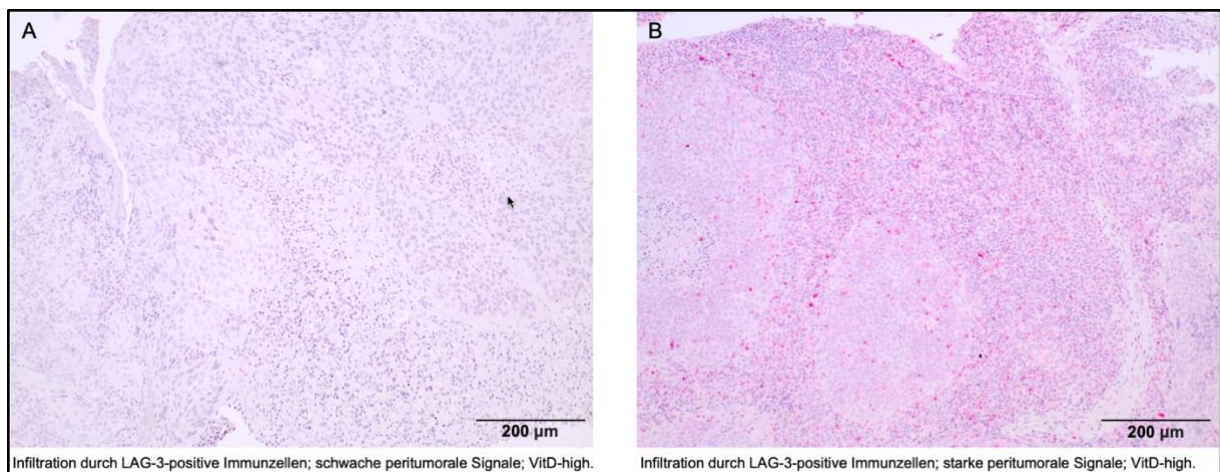


Abbildung 43: Vergleich zweier immunhistochemisch gefärbter Präparate von VitD-high-HNSCC-Patienten mit peritumorale Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen. In Bild A ist die LAG-3-Expression kaum und nur schwach sichtbar, während Bild B eine starke peritumorale Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen zeigt. 10x Vergrößerung.

8.6.3. Einfluss der LAG-3-Expression intra- und peritumoraler Immunzellen auf das Gesamtüberleben

Die Gesamtüberlebensraten (overall survival, OS) des Patientenkollektivs wurden mithilfe des Mantel-Cox-Tests (Log-Rank-Test) ausgewertet, wobei ein möglicher Zusammenhang zwischen der durch den Primärantikörper LAG-3 detektierten spezifischen Immunzellinfiltration (T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und dendritische Zellen) mit dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht wurde. Auch hier wurden die Patienten vorab einer low-Expressionsgruppe (IRS-Werte unterhalb des Mittelwerts aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) und einer high-Expressionsgruppe (IRS-Werte gleich oder größer als der Mittelwert aller IRS-Werte der intratumoralen bzw. peritumoralen Analyse) zugeordnet und beide Gruppen verglichen. Zwei separate Überlebensanalysen wurden durchgeführt für den intratumoralen und den peritumoralen Bereich der immunhistochemisch gefärbten Gewebepreparate der HNSCC-Patienten. In der peritumoralen Analyse wurden 48 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 68 HNSCC-Patienten der low-Expressionsgruppe zugeordnet, in der intratumoralen Analyse wurden 47 HNSCC-Patienten der high-Expressionsgruppe und 69 HNSCC-Patienten der low-Expressionsgruppe zugeordnet. In den Abbildungen 44 und 45 werden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt.

In Abbildung 44 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die peritumorale Analyse dargestellt, die zeigt, dass eine höhere LAG-3-Expression eine positive Korrelation zu einem verbesserten Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten hat im Vergleich zu einer niedrigen LAG-3-Expression. Der p-Wert des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) betrug $p = 0,0142$ und der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests $p = 0,0221$. Das mediane Überleben beider Gruppen konnte statistisch nicht erhoben werden, da die Überlebensraten nach der letzten Abfrage der Studienteilnehmer und somit dem Eintreffen des Ereignisses bei $> 50\%$ lagen („Median undefined“). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei der Low-Expressionsgruppe 2,2, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,5 betrug.

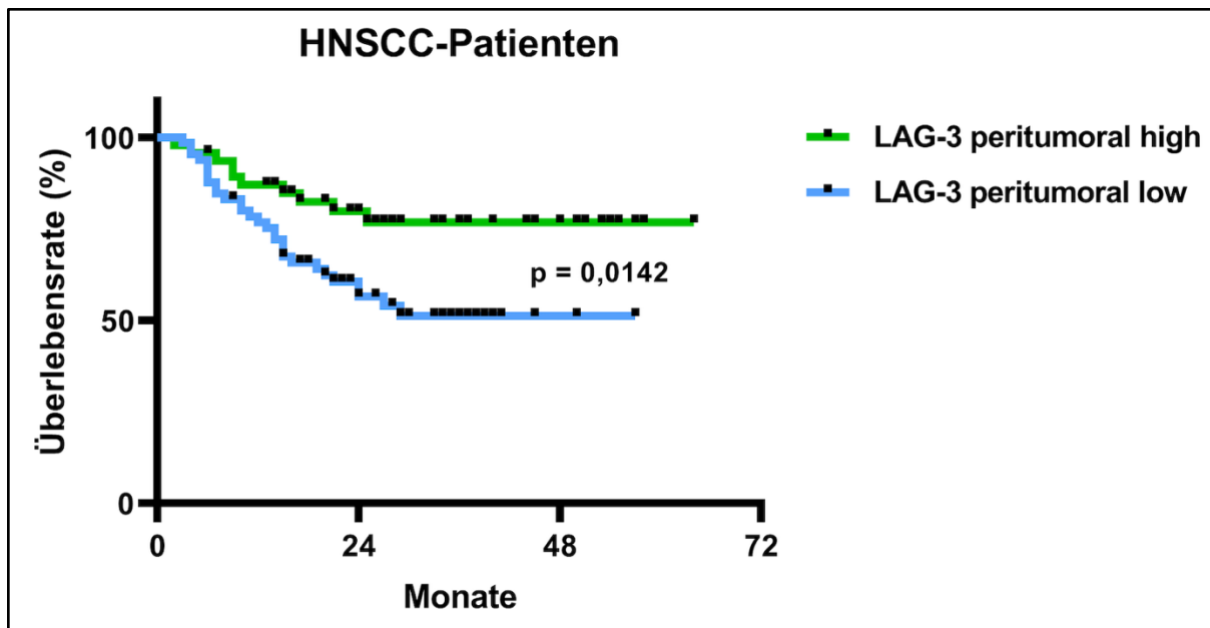


Abbildung 44: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der LAG-3-Expression der peritumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der LAG-3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die LAG-3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,0142$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

In Abbildung 45 wird die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die intratumorale Analyse dargestellt. Hier konnte mit einem p-Wert von $p = 0,3364$ des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) statistisch kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten bei einer starken LAG-3-Expression im Vergleich zu einer schwachen LAG-3-Expression gezeigt werden. Der p-Wert des Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests betrug $p = 0,4108$. Auch hier konnte das mediane Überleben statistisch nicht errechnet werden. Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) lag bei der Low-Expressionsgruppe bei 1,4, während die Hazard Ratio bei der High-Expressionsgruppe 0,7 betrug.

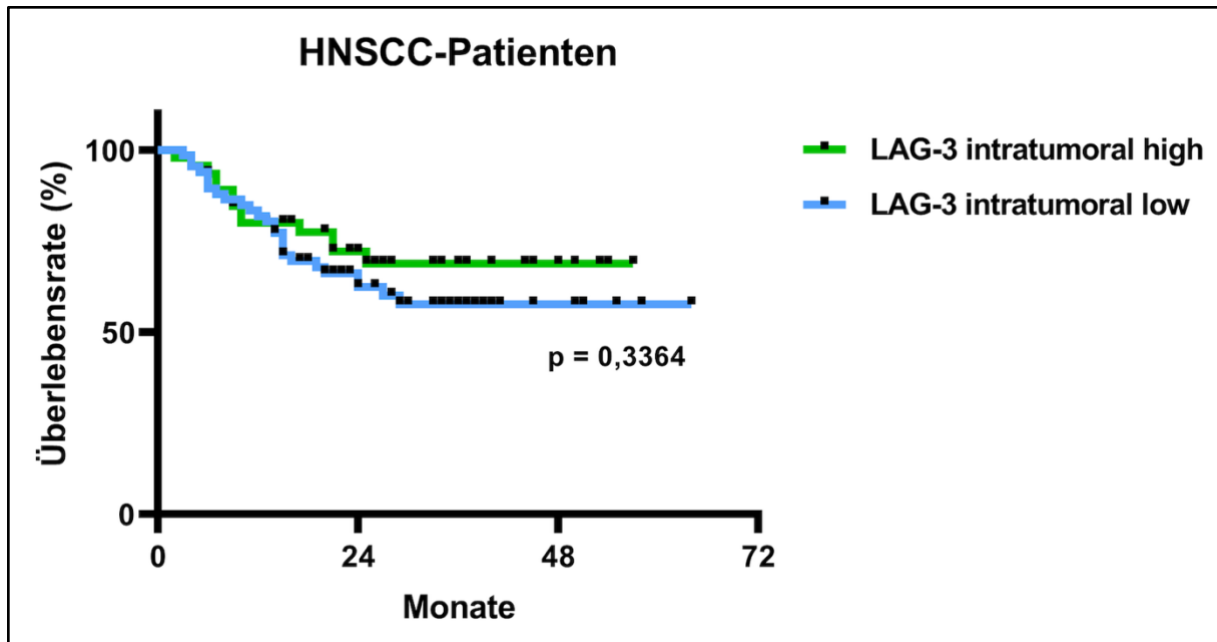


Abbildung 45: Statistische Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der LAG-3-Expression der intratumoralen Immunzellen anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Die grüne Kurve repräsentiert die Analyse der LAG-3-high-Expressionsgruppe und die blaue Kurve steht für die LAG-3-low-Expressionsgruppe. Auf der y-Achse wird die Überlebensrate (%) von 0-100% dargestellt, während auf der x-Achse die überlebten Monate von 0-72 Monaten gezeigt werden. Der p-Wert beträgt $p = 0,3364$ und ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch nicht signifikant. Die schwarzen Punkte repräsentieren zensierte Daten.

9. Diskussion

Die Relevanz weiterer Krebsforschung und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte wird durch das häufige Auftreten mit noch steigendem Trend bösartiger Karzinome weltweit unterstrichen. Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind maligne Tumore die zweithäufigste Todesursache im Jahr 2020. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs) führten im Jahr 2018 global zu 450.000 Todesfällen und stellen die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit dar. Bis 2030 wird mit einem weiteren Zuwachs von HNSCCs um bis zu 30% weltweit gerechnet, was überdies die Relevanz weiterer Forschung in der HNO-Onkologie unterstreicht (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Sung et al., 2021). Neue therapeutische Erkenntnisse sind zwingend erforderlich, da die Überlebenschancen von HNSCC-Patienten trotz maximalem Therapieaufwand noch immer schlecht sind. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Karzinome der Mundhöhle und des Rachens liegt bei betroffenen Frauen bei 62%, während sie bei betroffenen Männern sogar nur bei 52% liegt. Das Larynxkarzinom, welches vor allem bei Männern auftritt, hat eine 5-Jahres-Überlebensrate von 64% beziehungsweise 63% bei Frauen (RKI, 2021). Sobald es zu einer lymphogenen Metastasierung mit einer Invasion über die Lymphknotenkapsel hinauskommt, verringert sich die Überlebensrate noch weiter (Myers et al., 2001).

9.1. Tumormikroumgebung und Bedeutung der Stroma Seneszenz und T-Zellerschöpfung

Die Tumormikroumgebung von HNSCCs ist ein hochkomplexes System, bestehend aus zellulären Bestandteilen, wie tumorassoziierten Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, neuroendokrinen Zellen, T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und myeloiden Suppressorzellen sowie Zellen der Blut- und Lymphgefäße (Chaudhary et al., 2019; Curry et al., 2014; Peltanova et al., 2019). Zu den nicht-zellulären Bestandteilen der Tumormikroumgebung zählen unter anderem Proteine der Extrazellulärmatrix, wie Kollagen, Fibronectin, Elastin, Laminin und Tenascin. In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass Stromazellen die Proliferation, Invasion, Metastasierung und das Überleben von Tumorzellen positiv beeinflussen, indem sie Nährstoffe, Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Tumorzellen bereitstellen (Cheng et al., 2013; Dobrenis et al., 2015; Hu et al., 2015; Oft et al., 1998). Zudem gelingt es den Tumorzellen der Erkennung durch das körpereigene Immunsystem zu entgehen, da

Stromazellen tumorassoziierte Fibroblasten, sowie tumorfördernde Immunzellen und Entzündungszellen rekrutieren können (Egeblad et al., 2010; Quezada et al., 2011). Die Mikroumgebung nimmt daher einen erheblichen Einfluss auf die Tumorzellbiologie und den klinischen Verlauf von HNSCCs, da sie die Entwicklung eines aggressiven biologischen Verhaltens und die Therapieresistenz fördert und somit die Prognose betroffener Patienten negativ beeinflusst (Bhat et al., 2021; Denton et al., 2018; Soysal et al., 2015). Zusammenfassend wird daher angenommen, dass das Tumormikromilieu eine vorteilhafte Umgebung für den Tumor bezüglich seines Wachstums, seiner Metastasierung und seiner Resistenzentwicklung darstellt (Giancotti, 2014). Jüngste Studien konnten zeigen, dass eine bessere Therapiewirksamkeit erzielt werden kann, wenn sowohl Krebszellen als auch Komponenten der Tumormikroumgebung als therapeutische Zielstrukturen wahrgenommen werden (Arneth, 2019). In diesem Zusammenhang beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit fünf verschiedenen Schlüssel molekülen der Stroma Seneszenz (IL-8 und MMP3) und der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3 und LAG-3), um die Tumormikroumgebung von HNSCCs zu charakterisieren und deren Zusammenhänge mit der Tumorzellbiologie und dem klinischen Verlauf von HNSCC-Tumoren herauszuarbeiten.

Die Seneszenz als ein Zustand des permanenten Zellzyklus-Stillstands ist ein unvermeidbarer Prozess vieler Lebewesen und kennzeichnet sich durch eine abnehmende Funktion vieler Zellen und Gewebe (Deng et al., 2022). Die Stroma Seneszenz tritt einerseits physiologisch, während der Wundheilung oder der Embryogenese auf (Demaria et al., 2014; Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013), sie beschleunigt andererseits die Alterung des Organismus und hat einen wichtigen Stellenwert in pathologischen Vorgängen wie der Krebsentstehung (Demaria et al., 2017; Hernandez-Segura et al., 2018). Der beschleunigte Alterungsprozess kann zu einer abnormalen Zellproliferation führen, welche eine genomische Instabilität begünstigt und vorteilhaft ist für die abnormalen Zellen bezüglich ihrer Proliferation, Migration und dem Entkommen vor dem Immunsystem (Campisi, 2013; Pérez-Mancera et al., 2014). Dies sind Merkmale eines malignen Tumorgeschehens, welche die tumorfördernden Effekte durch die Seneszenz unterstreichen, jedoch sind auch tumorhemmende Wirkungen bekannt, da durch den Wachstumsstillstand in präkanzerösen Zellen die Tumorentstehung ebenso verhindert werden kann (Ruhland et al., 2016; Yuan et al., 2018). Die gegenteiligen Rollen der Seneszenz in der Tumorentstehung und Tumorentwicklung, vor allem bei HNSCCs sind sehr komplex und noch nicht ausreichend erforscht. In verschiedenen Studien konnte eine therapieinduzierte Seneszenz durch Strahlen- und Chemotherapie bereits beobachtet werden, welche sich positiv auf den Behandlungsverlauf von Tumorpatienten ausgewirkt hat und somit als therapeutisches Ziel fungieren kann (Ewald et al., 2010; Hari et al., 2019; Zhao et al., 2020). Seneszenten Zellen

zeigen verschiedene Merkmale, darunter die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren, die dem seneszenzbedingten sekretorischen Phänotyp (SASP) (Birch & Gil, 2020) entsprechen. Zum einen werden immunsuppressive Zytokine ausgeschüttet, welche das Tumorgeschehen fördern können und zum anderen kommt es durch verschiedene Zytokine und Enzyme zu immunstimulierenden Effekten, die durch die Rekrutierung von Lymphozyten und Metalloproteinasen der Karzinogenese entgegenwirken (Glück et al., 2017; Hoare et al., 2016; Ruhland et al., 2016). Jüngste Studien mit transgenen Mäusen, in denen die Wechselwirkungen von p16-exprimierenden seneszenten Zellen und dem Alterungsprozess sowie altersbedingten Krankheiten untersucht wurden, zeigten, dass durch die Eliminierung der seneszenten Zellen Metastasen und Rezidive verringert wurden (Demaria et al., 2017). Es gibt also verschiedene Strategien sich die zelluläre Seneszenz zunutze zu machen, um einen Tumor zu bekämpfen. Die Senotherapie umfasst das Ziel, seneszente Zellen selektiv durch pharmakologische Ansätze zu eliminieren, jedoch darf nicht vergessen werden, dass seneszente Zellen auch nützliche Effekte haben können. Zukünftige Behandlungsstrategien sollten daher das vorrangige Ziel verfolgen, eine Balance zwischen der gewünschten hemmenden Ausschüttung von immunsupprimierenden Zytokinen durch SASP, welche der Gewebemöostase schädigen und der Förderung des Tumorsuppressionsmechanismus in seneszenten Zellen, zu finden (Prieto & Baker, 2019).

Neben der Stroma Seneszenz spielt die T-Zellerschöpfung ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Beeinflussung der Tumormikroumgebung und somit des Tumorgeschehens. Durch eine anhaltende Antigenstimulation im Rahmen von chronischen Virus- oder Tumorerkrankungen können T-Zellen in einen Erschöpfungszustand übergehen und dann eine nur noch eingeschränkte Funktionalität zeigen. Verschiedene Prozesse führen dazu, dass es durch den Erschöpfungszustand der T-Zellen zu einer verminderten Eliminierung von Tumorzellen und einer gesteigerten Tumorprogression kommt (Jiang et al., 2015). In der Tumormikroumgebung exprimieren erschöpfte T-Zellen zum Beispiel deutlich mehr hemmende Rezeptoren beziehungsweise charakteristische Immuncheckpoint Moleküle, sie verringern die Produktion von Effektorzytokinen und sie zeigen eine verminderte Anti-Tumor-Aktivität (Kaltenmeier et al., 2021). Zu den hemmenden Rezeptoren (Immuncheckpoint-Moleküle), die von den erschöpften T-Zellen in der Tumormikroumgebung verstärkt exprimiert werden, gehören unter anderem PD1, LAG-3 und TIM 3 (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009; Crawford & Wherry, 2009; Fourcade et al., 2012; Jin et al., 2010) und zu den tumorhemmenden Effektorzytokinen, die vermindert produziert werden, zählen Interleukin-2, Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ und Granzym B. Außerdem kommt noch hinzu, dass erschöpfte T-Zellen nicht mehr in der Lage sind, Gedächtniszellen zu bilden, um bei einer erneuten Expression der gleichen oder ähnlicher Antigene eine sofortige starke

Immunantwort zu generieren. Schlussendlich werden erschöpfte T-Zellen in der Tumormikroumgebung eliminiert (Jiang et al., 2015). Das Ziel von Studien der letzten Jahre bestand darin, einen Weg zu finden, die erschöpften T-Zellen wieder in einen aktiveren und funktionsfähigeren Zustand zu bringen, um eine effektive Immunantwort im Kampf gegen Krebszellen gewährleisten zu können. Immuncheckpoint-Inhibitoren kommt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle zu, wovon bereits zwei PD1-Antikörper von der Food and Drug Administration (FDA) und der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) als second-line Therapie bei Patienten mit rezidivierten oder fernmetastasierten HNSCCs (R/M-HNSCCs) bei einem Progress während oder innerhalb von 6 Monaten nach einer Platin-basierten Therapie zugelassen sind (Botticelli, Cirillo, et al., 2021; Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016; Ferris et al., 2019; Gillison et al., 2022; Gillison et al., 2018). Der Einsatz von Pembrolizumab in dieser Indikation ist dabei an eine hohe Expression von PD-L1 in den Tumorzellen gebunden (TPS>50%; tumor proportion score). Zusätzlich ist Pembrolizumab in der Erstlinientherapie bei R/M-HNSCC-Patienten als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie bei einem CPS>1 (combined PD-L1 positivity score) seit 2019 zugelassen (Burtness et al., 2019; Johnson et al., 2020; Rischin et al., 2022). Darüber hinaus werden viele Studien durchgeführt, um weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren ausfindig zu machen sowie die Kombination verschiedener Checkpoint-Inhibitoren zu erproben, damit das Behandlungsspektrum und infolgedessen die Prognose betroffener HNSCC-Patienten verbessert werden kann. Leider ist die Ansprechrate der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren bei vielen HNSCC-Patienten noch gering und liegt im Durchschnitt bei unter 25%, was die Wichtigkeit weiterer Forschungsarbeiten für die Entwicklung einer besseren Therapiewirksamkeit unterstreicht.

9.2. Analyse des untersuchten Patientenkollektivs

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebepräparate von 116 HNSCC-Patienten mit fünf Primärantikörpern immunhistochemisch gefärbt. Aus epidemiologischen Daten geht hervor, dass Männer vier Mal häufiger an einem HNSCC erkranken als Frauen (Ferlay et al., 2006), was sich ebenfalls in der Geschlechterverteilung des untersuchten Patientenkollektivs zeigte. Von den 116 untersuchten HNSCC-Patienten waren 97 Patienten männlich und nur 19 Patienten weiblich. Tumore der Kopf-Hals-Region werden zu 90% als Plattenepithelkarzinom klassifiziert (Vokes et al., 1993) und treten vor allem in Mundhöhle, Pharynx und Larynx auf (Schmezer & Plass, 2008). Die Verteilung der Tumorlokalisationen der untersuchten HNSCC-Patienten in dieser Arbeit zeigte sich ähnlich. Die meisten Fälle waren dem Larynx, Oropharynx und der Zunge zuzuordnen. Das humane Papillomvirus zählt zusammen mit

Alkohol- und Tabakkonsum zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines HNSCCs und hat zudem eine Relevanz als prognostischer und prädiktiver Biomarker. In dem untersuchten Patientenkollektiv hatten 94 Patienten einen HPV-Tumor, während 22 Patienten des Kollektivs einen HPV⁺-Tumor aufgewiesen haben. Große Meta-Analysen zeigten, dass 32 % der HNSCCs weltweit mit HPV assoziiert sind, wobei die Raten bei Karzinomen des Oropharynx höher sind als bei anderen HNSCC-Primärtumorlokalisationen (Ndiaye et al., 2014). Mit einer Quote von 22 HPV⁺-HNSCC-Patienten im Gesamtkollektiv von 116 HNSCC-Patienten liegt der Anteil der HPV-assoziierten HNSCCs in dem untersuchten Patientenkollektiv damit leicht unterhalb der Daten aus den großen Metaanalysen, jedoch unterliegt die Rate HPV-assoziiierter HNSCCs bekanntermaßen geographischen und zeitlichen Schwankungen. Der Serumwert von Vitamin D wurde ebenfalls als Merkmal bei den untersuchten HNSCC-Patienten erhoben, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Immunezellinfiltration, welche durch die immunhistochemische Färbung mit den Primärantikörpern sichtbar gemacht wurde, und dem Vitamin D-Status zu analysieren. Das Patientenkollektiv wurde dafür in eine VitD-high-Expressionsgruppe (VitD-Serumwert ≥ 10 ng/ml) und in eine VitD-low-Expressionsgruppe (VitD-Serumwerte < 10 ng/ml) eingeteilt. Ab welchem Schwellenwert der Vitamin D-Serumspiegel eine ausreichende Versorgung anzeigt, ist umstritten und ebenfalls international nicht einheitlich. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) und das Institute of Medicine (IOM) definieren einen mangelhaften Vitamin D-Status beispielsweise bei Serumwerten < 12 ng/ml und einen ausreichenden Status bei Vitamin D-Serumwerten > 20 ng/ml (Rabenberg et al., 2015). Patienten mit Vitamin D-Serumwerten zwischen 12 ng/ml und 20 ng/ml haben laut der DGE eine suboptimale Versorgung. Anhand dieser Schwellenwerte beschreibt eine Statistik, dass 30,2% der Erwachsenen eine mangelhafte Vitamin D-Versorgung haben, wobei die Messungen nicht nur saisonalen Schwankungen unterlagen, sondern auch geschlechtsabhängige und altersabhängige Unterschiede zeigten und je nach sozioökonomischem Status variierten. Frauen zeigten bei steigendem Alter eine höhere Tendenz zu einer mangelhaften Vitamin D-Versorgung, während bei Männern die Vitamin D-Serumwerte altersunabhängig stabil waren. Zudem zeigten Erwachsene mit einem niedrigen sozioökonomischen Status signifikant häufiger eine mangelnde Vitamin D-Versorgung. Die Vitamin D-Serumwerte der untersuchten Patienten in dieser Arbeit wurden zu einem einzigen Zeitpunkt während der Verlaufsbeobachtung erhoben und sind unabhängig von der Jahreszeit, dem sozioökonomischen Status und weiteren Verlaufswerten in die Statistik miteingeflossen. Dies könnte dazu geführt haben, dass die erhobenen Vitamin D-Serumwerte nicht mit absoluter Sicherheit repräsentativ für den allgemeinen Vitamin D-Status der jeweiligen HNSCC-Patienten sind, welcher je nach Zeitpunkt, Alter, Geschlecht und sozioökonomischen Status durchaus variieren kann

beziehungsweise beeinflusst sein könnte (Rabenberg et al., 2015). So kam es in dem untersuchten Patientenkollektiv zu einer annähernd gleichen Verteilung in die VitD-low- und VitD-high-Expressionsgruppen (59 VitD-low: 57 VitD-high). Damit die Ergebnisse gesamtheitlich noch repräsentativer sind, wäre eine umfangreichere Stichprobengröße vorteilhaft gewesen. Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 116 HNSCC-Patienten, die größtenteils aus der saarland-pfälzischen Region stammten. Zudem hätte das Follow-Up der Patienten über einen längeren Zeitraum verfolgt werden können, um eine umfangreichere Beurteilung des Krankheitsverlaufs erheben zu können. Zusammengefasst kann damit an dieser Stelle festgestellt werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv repräsentativ für die Gesamtheit der HNSCC-Patienten im europäischen Raum bezüglich der Tumorphistologie, -lokalisierung und -pathogenese war und damit die Untersuchungen in dieser Arbeit zuverlässige Rückschlüsse auf die Kopf-Hals-Onkologie im Allgemeinen erlauben.

9.3. Abhängigkeit der Antikörper-Expression vom HPV- und Vitamin D-Status

In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem Einflüsse durch eine HPV-Infektion und durch Vitamin D auf die Expression der untersuchten Marker in der Tumormikroumgebung bei HNSCC-Patienten untersucht. Führt eine HPV-Infektion eines Patienten, der von einem Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Halsregion betroffen ist, zu einer stärkeren Immunzellinfiltration und möglicherweise zu einer besseren Prognose aufgrund höherer Therapieansprechraten? Dies ist eine spannende Frage, da die Infektion mit dem humanen Papillomvirus als bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines HNSCCs gilt, wobei in den letzten Jahren ein zunehmend steigender Trend von HPV-induzierten HNSCCs beobachtet werden kann, während Noxen-induzierten HNSCCs immer seltener auftreten (Gillison et al., 2015; Lechner et al., 2022; Wittekandt et al., 2019).

In dieser Arbeit zeigten zwei (PD1, TIM 3) der drei untersuchten Marker der T-Zellerschöpfung eine signifikante Korrelation zwischen einer HPV-Infektion der HNSCC-Patienten und einer stärkeren Immunzellinfiltration, sowohl im Tumor als auch peritumoral. Ähnliche Zusammenhänge wurden bereits in früheren Studien beschrieben (Krishna et al., 2018; Mueller & Ahmed, 2009), sodass angenommen werden könnte, dass es zu einer stärkeren Immunzellinfiltration im Tumormikromilieu kommt, wenn im Rahmen eines HPV⁺-HNSCCs T-Zellen in einen Erschöpfungszustand fallen. HPV⁺-HNSCCs unterscheiden sich molekular stark von HPV⁻-HNSCCs und weisen zudem ein abweichendes Mutationsspektrum auf (Network, 2015). Die Tumorummunlandschaft von HPV⁺-HNSCCs wird durch die Expression von exogenen als Neoantigene wirkenden viralen Proteinen geprägt, welche zu

einer Suppression von Zellwachstum und Genexpression führen (Ang et al., 2010; Fakhry et al., 2008). Wie auch in der vorliegenden Arbeit haben viele weitere Studien eine deutlich stärkere Immunzellinfiltration und eine höhere CD8⁺-T-Zell-Aktivierung bei HPV⁺-HNSCCs festgestellt im Vergleich zu HPV⁻-HNSCCs (Mandal et al., 2016; Solomon et al., 2018). Evidenz gibt es nicht nur dafür, dass HPV⁺-HNSCCs eine starke Th1-Immunantwort und eine verstärkte Infiltration mit dendritischen Zellen, CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen zeigen, sondern auch eine deutlich höhere Expression von Markern der T-Zellerschöpfung, wozu PD1, LAG-3 und TIM 3 gehören (Gameiro et al., 2018). Dieses Genexpressionsprofil definiert sich durch eine Dominanz von T-Zell-Markern und Chemokinen, die zu einer verstärkten Rekrutierung von Effektor-T-Zellen führen (Gajewski et al., 2013). Klinisch zeigt sich ein wichtiger Unterschied beider HNSCC-Typen, da die erhöhte Expression von T-Zellerschöpfungsmarkern mit einer besseren Gesamtüberlebensrate der Patienten einhergeht (Gameiro et al., 2018). Ein Verständnis der Unterschiede zwischen den Immunlandschaften beider HNSCC-Typen ist deshalb bedeutend, da eine starke Expression dieser inhibitorischen Moleküle bei hauptsächlich HPV⁺ Ätiologie die Behandlungsstrategie in Form einer Immuntherapie aufgrund tendenziell besserer Ansprechraten als potenziell geeigneter erscheinen lässt. PD1, LAG-3 und TIM 3 könnten als potenzielle prädiktive Biomarker relevant werden, welche mit einem verbesserten Gesamtüberleben betroffener HNSCC-Patienten korrelieren und gleichzeitig das Behandlungsspektrum in Richtung des Einsatzes von Immuncheckpoint-Inhibitoren anstelle von Chemo- oder Strahlentherapien verschieben könnten. Die untersuchten Marker der Stroma Seneszenz zeigten hingegen andere Ergebnisse. MMP3 zeigte eine signifikante Korrelation mit einer höheren intratumoralen Immunzellinfiltration und HPV⁻-HNSCCs.

Ebenso wurde der Einfluss des Vitamin D-Status auf die Expression der untersuchten Marker in der Tumormikroumgebung in dieser Arbeit untersucht. Zwar waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant, jedoch zeigten sich Trends bei zwei der drei T-Zellerschöpfungsmarker (PD1 und TIM 3), die auf potenzielle Zusammenhänge zwischen einem hohen Vitamin D-Serumwert des HNSCC-Patienten und einer stärkeren Immunzellinfiltration hinweisen könnten. Potenzielle Einflüsse durch Vitamin D auf das Immunsystem im Rahmen von Tumorerkrankungen rückten in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Um mögliche Immunmodulatoren mit der Aussicht auf weitere Therapiekonzepte bei HNSCCs zu identifizieren, wurden viele präklinische *in-vitro* und *in-vivo* Studien durchgeführt, die protektive Wirkungen durch Vitamin D bezüglich des Auftretens und Fortschreitens der Erkrankung zeigten. Höhere Vitamin D-Spiegel führten zum Beispiel in *in-vitro*-Modellen von HNSCCs zu einer gesteigerten zellulären Differenzierung und genomischen Integrität, sowie zu einer gehemmten Invasion

und Metastasierung (Chiang et al., 2013; Lin et al., 2002; S. W. Yang et al., 2016). Je nach Tumorentität und Patient kann die Expression von PD1 variieren, wie dies verschiedene Studien zeigten. Bei Patienten mit Morbus Crohn führten höhere Vitamin D-Spiegel zu höheren PD1-Expressionen auf CD4⁺-T-Zellen (Bendix et al., 2017). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der *in-vitro* Stimulierung von CD4⁺-T-Zellen mit Vitamin D3 beobachtet, da auch hier eine vermehrte Expression von PD1 beschrieben wurde (Sheikh et al., 2018). Patienten mit einer zystischen Fibrose hingegen zeigten eine verminderte PD1-Expression auf CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen bei vorheriger Vitamin D-Behandlung (Pincikova et al., 2017). Bezüglich der T-Zellerschöpfung zeigten *in-vitro* Studien, dass Vitamin D3 CD4⁺-T-Zellen wieder in einen aktiveren Zustand zurückbringen konnte (Li et al., 2022). Auch das Forschungslabor der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes führte verschiedene Studien durch, um den Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem bei HNSCC-Patienten zu untersuchen. Es zeigte sich, dass HNSCC-Patienten einen signifikant niedrigeren Vitamin D-Serumspiegel aufweisen als gesunde Kontrollpersonen und dies mit einer lymphatischen Metastasierung und einem negativen HPV-Tumorstatus zusammenhängt. Zudem korrelierte ein niedriger Vitamin D-Spiegel mit einem schlechteren Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten und fungierte somit als signifikanter Prädiktor des Überlebens. Immunhistochemische Färbungen zeigten außerdem eine signifikant höhere intratumorale und/oder stromale Infiltration von CD3⁺-T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen, CD68⁺-Makrophagen und M1-Makrophagen bei HNSCC-Patienten mit einem hohen Vitamin D-Spiegel (Bochen et al., 2018). Vitamin D könnte demnach als potenzieller Immunmodulator angesehen werden, welcher in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren aufgrund einer gestärkten Immunabwehr gegen Tumorzellen effektive Therapieergebnisse erzielen kann.

9.4. Prognostische Relevanz der Surrogatmarker der Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) für Kopf-Hals-Tumore

Wie in vorherigen Kapiteln bereits beschrieben, hat die Stroma Seneszenz einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorgenese sowie Tumormikroumgebung von HNSCCs. IL-8 und MMP3 wurden als Marker der Stroma Seneszenz in dieser Arbeit untersucht, um zum einen potenziell prognostische Biomarker ausfindig zu machen und zum anderen mögliche neue therapeutische Zielstrukturen zu finden. Könnten zukünftig mithilfe von Biomarkern wie IL-8 und MMP3 genauere Aussagen über den klinischen Verlauf von HNSCC-Patienten getroffen, neue Behandlungsstrategien entwickelt, sowie infolgedessen das Gesamtüberleben betroffener HNSCC-Patienten verbessert werden?

IL-8 ist als proinflammatorisches Chemokin bedeutend für die Entzündungsreaktion in der Tumormikroumgebung von HNSCCs und sorgt für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Durch Einflüsse der Tumorprogression, Metastasierung und Invasion trägt IL-8 maßgeblich zur HNSCC-Tumorgenese bei (Baggiolini et al., 1989; Keatings et al., 1996; Waugh & Wilson, 2008). Die Wechselwirkung mit der Tumormikroumgebung hinsichtlich der Stromalen Seneszenz ist bedeutend für die Karzinogenese und wird daher im Folgenden genauer betrachtet. Es gibt verschiedene Formen der Seneszenz, wie zum Beispiel den seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), bei dem seneszente Zellen entzündungsfördernde Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen sezernieren, welche das Tumorwachstum unterstützen können (Coppé et al., 2010). IL-8 ist bekannt dafür, dass es die SASP-Reaktion in der Tumormikroumgebung aufrechterhalten und fördern kann (Coppé et al., 2010; Coppé et al., 2008). Es gibt bereits einige Studien, die sich mit dem Einfluss von IL-8 auf die Tumormikroumgebung vieler humaner Karzinome beschäftigen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. 2004 beschrieb eine Studie, dass IL-8 bei Brustkrebspatientinnen im Serum erhöht ist und eine unabhängige prognostische Bedeutung für das Überleben nach einem Rezidiv darstellt und zum Prozess der Tumorzellverbreitung beiträgt (Benoy et al., 2004; Yao, Lin, Chua, et al., 2007; Yao, Lin, Ye, et al., 2007). Es gibt zudem Studien über die Regulierung von IL-8 bei verschiedenen Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms in denen gezeigt werden konnte, dass die Zugabe eines IL-8-Antikörpers das Wachstum von drei Zelllinien (SG, FG, L3.3) um bis zu 10% verlangsamen konnte. Allerdings war das Ergebnis statistisch nicht signifikant (Shi et al., 1999). Auch die onkologische Forschung der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde beschäftigte sich in den letzten Jahren vermehrt mit der Frage, inwiefern IL-8 Einflüsse auf die Tumormikroumgebung von HNSCCs nimmt. So wurde bereits beschrieben, dass IL-8 als pro-inflammatorischer Mediator in prämaligen Läsionen von HNSCCs hochreguliert wird (Bonomi et al., 2014; Johnson et al., 2014) und die Tumorprogression, Metastasierung und Invasion positiv beeinflusst (St John et al., 2004). Frühere Studien beschreiben, dass die Pathogenität von HNSCCs durch eine gesteigerte IL-8 Expression insofern beeinflusst wird, als dass sie einen Wachstumsvorteil für den Tumor bietet (Chan et al., 2016; Yuan et al., 2005). Die Tumorprogression wird durch IL-8 mittels seiner Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor für Tumorzellen und angiogener Faktor unterstützt (Shi et al., 1999; Yuan et al., 2005). Außerdem zeigten experimentelle Arbeiten bereits, dass IL-8 die Proliferation von drei differenzierten HNSCC-Zelllinien (SCC4, SCC9, SCC25) und deren Koloniebildung unterstützt. Wurde die Funktion von IL-8 RNAi-basiert gehemmt, konnte eine reduzierte Proliferation der behandelten HNSCC-Zelllinien beobachtet und deren Koloniebildung gehemmt werden (Chan et al., 2016). Dies unterstreicht die Bedeutung von IL-8 für die

HNSCC-Progression. Punyani et al. untersuchten mittels ELISA-Verfahren die IL-8-Konzentration im Speichel von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (oral squamous cell carcinoma, OSCC) und beschrieben, dass hierbei die IL-8-Konzentration im Vergleich zu der Patientengruppe mit Präkanzerosen, sowie der gesunden Kontrollgruppe signifikant höher war und IL-8 als prognostischer Biomarker für betroffene Patienten genutzt werden könnte (Punyani & Sathawane, 2013). Die prognostische Aussagekraft von IL-8 im Speichel bei Präkanzerosen war allerdings nicht signifikant, sodass hier noch vertiefende Studien durchgeführt werden sollten. Zudem könnte die Stichprobengröße in nachfolgenden Studien aufgestockt werden, um die Repräsentativität der Ergebnisse zu maximieren (Arellano-Garcia et al., 2008; Chan et al., 2016; Punyani & Sathawane, 2013). Eine Studie von Li et al. beschreibt, dass eine höhere Expression von IL-8 im primären Gewebe von Nasopharynxkarzinomen signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben, einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und einem kürzeren Überleben ohne Fernmetastasen der Patienten korreliert und IL-8 somit als unabhängiger prognostischer Faktor gesehen werden kann (Li et al., 2012). Außerdem wurde in dieser Studie von Li et al. bestätigt, dass IL-8 in Nasopharynxkarzinom-Zellen mit starker Metastasierungsneigung höher exprimiert wurde und es zu einer verstärkten Sekretion des IL-8-Proteins kam, im Vergleich zu Zelllinien, die weniger metastasierten. Eine artifizielle Überexpression von IL-8 in Nasopharynxkarzinom-Zellen mit geringer Metastasierungsneigung förderte überdies mittels eines autokrinen Sekretionsmechanismus eine verstärkte Migration, Invasion und Metastasierung (Li et al., 2012). Auch die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwiefern die IL-8 Expression mit dem Gesamtüberleben der untersuchten HNSCC-Patienten zusammenhängt und ob IL-8 somit als prognostischer Biomarker fungieren und Informationen über den klinischen Verlauf von HNSCC-Patienten geben kann. Unter den durchgeführten Versuchsbedingungen mittels Immunhistochemie zeigten die Ergebnisse allerdings, dass kein prognostischer Zusammenhang zwischen der IL-8 Expression und dem Gesamtüberleben der untersuchten HNSCC-Patienten weder in der intratumoralen noch in der peritumoralen Analyse bestand. HNSCC-Patienten, die IL-8 in höherem Maße exprimierten, zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens im Vergleich zu HNSCC-Patienten, deren Immunzellinfiltration nur eine geringe IL-8-Expression vorwies. Viele der zuvor beschriebenen Studien konnten zeigen, dass IL-8 eine entscheidende Rolle in der HNSCC-Karzinogenese spielt, jedoch bleibt die Frage um die Funktion als prognostischer Biomarker größtenteils ungeklärt. Die Studie von Punyani et al. führte im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit das ELISA-Verfahren durch, untersuchte die IL-8-Konzentration im Speichel und zeigte signifikante Ergebnisse von IL-8 als Biomarker bei OSCC-Patienten. Mittels immunhistochemischer Färbungen von Gewebepreparaten der HNSCC-Patienten konnten ähnliche Aussagen über IL-8 als Biomarker in dieser Arbeit nicht

getroffen werden. Auch Li et al. zeigten mit ihrer Studie, dass IL-8 durchaus als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben von Nasopharynxkarzinom-Patienten fungieren kann, wobei Lit et al. abweichende Versuchsbedingungen der immunhistochemischen Färbungen (Primärantikörper, Retrieval-Puffer, Demaskierungszeit, Antikörper-Verdünnung) und nur Patienten mit Karzinomen des Nasopharynx eingeschlossen hatten. Letztlich sind größere Studien an umfangreicheren Patientenkollektiven mit balancierten Primärtumorlokalisationen erforderlich, um idealerweise in einem prospektiven randomisierten Studiendesign basierend auf Multivarianzanalysen die unabhängige prognostische Relevanz von IL-8 bei Kopf-Hals-Karzinomen besser beurteilen zu können.

MMP3 (Matrix-Metalloprotease-3) gehört zu der Gruppe der Matrix-Metalloproteasen und spaltet Komponenten der Extrazellulärmatrix sowie Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren von Zellen. Für eine erfolgreiche Tumorinvasion und Metastasierung durch Tumorzellen sind bewegliche Tumorzellen, sowie eine Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion und eine Umgestaltung der Extrazellulärmatrix wichtige Voraussetzungen (Woodhouse et al., 1997). Da MMPs in der Lage sind, die Extrazellulärmatrix ab- und umzubauen, können sie eine lokale Invasion des Tumors und eine Metastasierung unterstützen (Liotta, 1986). Tatsächlich wurde bereits ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen MMP3-Expression und der Invasionsfähigkeit von oralen Plattenepithelkarzinomen beschrieben (oral squamous cell carcinomas, OSCC) (Kurahara et al., 1999). Verschiedene Studien haben aufdecken können, dass bestimmte MMPs, darunter auch MMP3, nicht nur deutlich stärker in HNSCCS verglichen mit gesunder Mund- und Rachenschleimhaut exprimiert werden, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Tumorbildung und -progression spielen (Iizuka et al., 2014). In Microarray-Expressionsanalysen von HNSCC-Gewebeproben konnte bereits eine Überexpression von MMP3 und weiteren MMPs festgestellt werden, was sich in immunhistochemischen Studien ebenfalls bestätigte (Chung et al., 2004; Nagata et al., 2003). So beschrieben Ye et al., dass MMP3 zusammen mit weiteren MMPs beispielsweise bei Plattenepithelkarzinomen der Zunge vermehrt exprimiert werden (Ye et al., 2008). Da MMPs von einigen stromalen Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen, sowie malignen Epithelzellen gebildet werden, wurde der Fokus vieler Studien auf MMP-Expressionswerte im Serum gelenkt, um potenzielle nicht-invasive diagnostische und prognostische Biomarker bei HNSCCs ausfindig zu machen. Tatsächlich wurden höhere MMP3-Serumspiegel bei OSCC-Patienten nachgewiesen, was zunächst Aussagen bezüglich der Diagnose, nicht jedoch des klinischen Verlaufs und der Prognose erlaubte (Tadbir et al., 2012). Zudem können einige MMPs als prädiktive Marker für die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und das Risiko einer

Metastasierung genutzt werden. Ein hoher präoperativer MMP3-Serumspiegel spricht zum Beispiel bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen für eine hohe Rezidiv-Wahrscheinlichkeit (Gohji et al., 1996). Bislang gibt es kaum Studien, welche einen potenziellen Zusammenhang zwischen der Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit und der MMP3-Serumwerte für HNSCCs untersucht haben, was das Augenmerk zukünftiger Forschung jedoch dorthin lenken könnte. Für MMP2 konnte zum Beispiel bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression in Tumorzellen und einem höheren Risiko für Metastasen beim Plattenepithelkarzinom der Zunge gefunden werden (Yoshizaki et al., 2001). Mithilfe der Erstellung von Genexpressionsprofilen konnte zudem gezeigt werden, dass unter anderem die MMP3-Expression als Schlüsselmolekül für die Tumorentstehung und -progression von HNSCCs gewertet werden kann (Iizuka et al., 2014). Es gibt außerdem bereits viele prognostische Studien, die zeigen, dass eine erhöhte MMP-Expression zu einem schlechteren Gesamtüberleben verschiedener Karzinompatienten führt. Eine hohe Expression von MMP3 führt zum Beispiel bei Patienten mit einem metastasierten Melanom zu einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (Nikkola et al., 2002), während eine hohe MMP3-Expression bei Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom oder Urothelkarzinom nur einen begrenzten prognostischen Wert liefert (Gohji et al., 1996).

Vergleichbare Studien für MMP3 bei HNSCC-Patienten existieren bisher kaum, weshalb in der vorliegenden Arbeit ein potenzieller Zusammenhang zwischen der MMP3-Expression und dem Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten untersucht wurde. Unter den in dieser Arbeit vorherrschenden Versuchsbedingungen zeigten die Ergebnisse allerdings, dass kein prognostischer Zusammenhang zwischen der MMP3 Expression und dem Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten weder in der intratumoralen noch in der peritumoralen Analyse besteht. HNSCC-Patienten mit einer starken MMP3-Expression zeigten eine ähnliche Gesamtüberlebensrate, wie HNSCC-Patienten mit einer nur schwachen MMP3-Expression. Trotz einiger vielversprechender Studien, die durchaus tendenzielle Korrelationen der Biomarker mit dem Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten darstellen, ist die Interpretation der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher experimenteller Verfahren und statistischen Auswertungsanalysen noch schwierig und birgt einige Störfaktoren. Hinzu kommt die Heterogenität der verschiedenen Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, welche ebenfalls die Analyse neuer Biomarker erschwert. Ebenso muss beachtet werden, dass alle bisher veröffentlichten Studien einen Zusammenhang zwischen der Prognose von HNSCC-Patienten und der MMP3-Expression in den Tumorzellen untersuchten, während sich die vorliegende Arbeit auf die MMP3-Expression im immunologischen Tumormikromilieu fokussiert hatte. Letztlich scheint die MMP3-Expression der Tumorzellen wie auch der Tumor-infiltrierenden Leukozyten basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wie auch der genannten Studien keine wesentliche prognostische Relevanz für HNSCC-

Patienten zu haben, wobei auch hier ausreichend umfangreiche Studien mit hohem Evidenzgrad fehlen, um diese Fragestellung final beantworten zu können.

Bezüglich der Eignung als therapeutische Zielstruktur wurden bereits für viele verschiedene Tumorentitäten Studien zur potenziellen Wirksamkeit von MMP-Inhibitoren durchgeführt. *In-vitro* und in Mausmodellen zeigten MMP-Inhibitoren bereits gute Ergebnisse, allerdings konnten diese vielversprechenden Daten in klinischen Studien bisher nicht bestätigt werden (Coussens et al., 2002; Freije et al., 2003; Liotta & Kohn, 2001; Matrisian et al., 2003; Overall & López-Otín, 2002). Der Einfluss von MMP-Inhibitoren auf die Angiogenese wurde ebenfalls bereits genauer in Mausmodellen untersucht und dabei stellte sich heraus, dass es zu einer Hemmung der Angiogenese durch die MMP-Inhibitor-Behandlung kam (Shalinsky et al., 1999). Interessant ist auch, dass MMP3 Angiostatin aus Plasminogen erzeugen kann, was dazu führen könnte, dass aufgrund der inhibierenden Wirkung durch das Angiostatin, die Angiogenese und damit einhergehend auch das Tumorwachstum und die Entstehung von Metastasen gehemmt werden könnte (Brown, 2000; Dong et al., 1997; Lijnen et al., 1998; Patterson & Sang, 1997). Anstelle der Verwendung von Breitspektrum-MMP-Inhibitoren mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen, wie Muskel- und Skelettschmerzen (Nelson et al., 2000), sollte zukünftig mehr nach einem spezifischen MMP-Profil für die Behandlung bösartiger Tumoren des Menschen einschließlich HNSCCs geforscht werden (Vihinen & Kähäri, 2002).

9.5. Prognostische Relevanz der Surrogatmarker der T-Zellerschöpfung (PD1, TIM 3, LAG-3) für Kopf-Hals-Tumore

Die T-Zellerschöpfung rückte in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus wissenschaftlicher Forschungen, da sie nicht nur als Schwachstelle des Immunsystems im Rahmen von Tumorgeschehen erkannt, sondern auch als Möglichkeit für neue therapeutische Zielstrukturen wahrgenommen wurde. Zudem wird mit höchster Dringlichkeit daran geforscht, weitere potenzielle prognostische und prädiktive Biomarker für HNSCCs ausfindig zu machen, um künftig genauere Vorhersagen bezüglich der Prognose der Patienten und des Ansprechens auf die zur Verfügung stehenden Therapien treffen zu können und so potenziell langfristig die Prognose der Patienten zu verbessern. Als potenzielle Surrogatmarker der T-Zellerschöpfung wurden in der vorliegenden Arbeit die Proteine PD1, TIM 3 und LAG-3 immunhistochemisch untersucht.

PD1 ist ein Transmembranprotein und wird von T-Zellen und Pro-B-Zellen exprimiert. Es erfüllt die Funktion eines Immuncheckpoints und stabilisiert durch seine negative

regulatorische Beeinflussung während der T-Zell-Aktivierung das Gleichgewicht zwischen einer erwünschten Immunstimulation und ungewollten autoimmunologischen Phänomenen (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000; Greenwald et al., 2005; Tseng et al., 2001). Viele Studien der letzten Jahre beschäftigten sich bereits damit, PD1 als therapeutische Zielstruktur im Rahmen von HNSCCs zu untersuchen, was schließlich dazu führte, dass auf Grundlage der KEYNOTE-040-Studie, der KEYNOTE-048-Studie und der CheckMate-141-Studie Pembrolizumab und Nivolumab als PD1-Antikörper in den aktuellen Therapieleitlinien von HNSCCs Anwendung finden (s. Kapitel 6.2.4.). Durch die Hemmung des PD1-Rezeptors kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des Immunsystems, welche in einer effektiveren Immunabwehr gegen Tumorzellen resultiert. Um zu analysieren, inwiefern PD1 ebenso als prognostischer Biomarker eingesetzt werden kann, muss die allgemeine Immunzellinfiltration von der Anzahl an PD1⁺-infiltrierenden-Immunzellen unterschieden werden. Viele Studien der vergangenen Jahre haben bereits beschrieben, dass eine stärkere CD8⁺-T-Zell-Infiltration zu einer besseren Prognose von HNSCC-Patienten führt (Mandal et al., 2016; Mukherjee et al., 2020; Näsman et al., 2012; Spector et al., 2019), während dies andere Studien hingegen widerlegen konnten (Badoual et al., 2013; Poropatich et al., 2017; Quan et al., 2020; Wolf et al., 2015). Eine Studie von Pokrývková et al. analysierte retrospektiv 97 Gewebeproben von oralen und oropharyngealen Karzinomen mittels multispektraler Fluoreszenz-Immunhistochemie und identifizierte die Anzahl der PD1⁺-CD8⁺-T-Zellen als unabhängigen prognostischen Faktor, welcher erhebliche Einflüsse auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten nimmt. Mithilfe der Cox-Modelle wurde der Einfluss der Immunzellinfiltration auf die Prognose bewertet, wobei eine höhere Anzahl von PD1⁺-CD8⁺-T-Zellen im Stroma mit einem verbesserten Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten unabhängig ihres HPV-Tumorstatus korrelierte (Pokrývková et al., 2022). Auch die Ergebnisse der vorliegende Arbeit zeigten übereinstimmend damit, dass eine stärkere Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen mit einem besseren Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten des untersuchten Kollektivs korreliert, sowohl in der intratumoralen als auch in der peritumoralen Analyse. Da ausschließlich die Immunhistochemie in dieser Arbeit als Methode zur spezifischen Immunzelldetektion genutzt wurde, konnten die PD1⁺-Immunzellen nicht genauer differenziert werden. Die potenzielle Aussagekraft, PD1 als Surrogatmarker für HNSCCs zu verwenden wird dadurch unserer Ansicht nach allerdings nicht wesentlich geschmälert. In weiteren multivariaten Analysen der letzten Jahre wurde der HPV-Tumorstatus berücksichtigt, was den bekannten und in der klinischen Praxis etablierten Zusammenhang bestätigte, dass ein positiver HPV-Tumorstatus der stärkste unabhängige Prognosefaktor für das Gesamtüberleben darstellt (Koslabova et al., 2013; Rotnáglová et al., 2011). Eine verstärkte Immunzellinfiltration bei positivem HPV-Tumorstatus könnte damit begründet sein, dass aufgrund der viralen Antigenpräsentation das Immunsystem ohnehin

stärker stimuliert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar der HPV-Tumorstatus erhoben, jedoch wurde dieser nicht in der prognostischen Überlebensanalyse der Tumormikroumgebungs-Marker eingeschlossen, was eine Aussage bezüglich des Einflusses von HPV auf das Gesamtüberleben verhindert. Für die nahe Zukunft sind diesbezüglich Multivarianzanalysen basierend auf den in dieser Arbeit dargestellten Daten geplant, um diesen Zusammenhang näher aufzuklären. Es ist noch immer umstritten, inwiefern PD1 als unabhängiger prognostischer Biomarker fungieren kann, da das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen und Rezeptoren in der Tumormikroumgebung sehr komplex ist. Ausschlaggebend scheint die genauere Identifikation der Funktion der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) zu sein. PD1 wird als Marker der T-Zellerschöpfung angenommen, welcher auf Grundlage einer anhaltenden Antigenstimulation auf einen erschöpften und somit funktionsgeschwächten Zustand der T-Zellen hindeutet. Jedoch ist es möglich, dass speziell in der Tumormikroumgebung der Expression von PD1 keine weitere Expression co-inhibitorischer Rezeptoren folgt, was in der Annahme resultiert, dass PD1 als T-Zellerschöpfungsmarker nicht zweifelsfrei bestätigt ist (Badoual et al., 2013; Xu et al., 2020). Um zusätzlich die entscheidende Funktion der PD1⁺-CD8⁺-T-Zellen im Tumormikromilieu genauer zu identifizieren, könnten zum Beispiel weitere Erschöpfungsmarker mit anderen Methoden, wie der Durchflusszytometrie untersucht werden (Pokrývková et al., 2022). Andere Studien zeigten, dass PD1⁺-TILs im direkten Vergleich zu den PD1⁻-TILs tumorspezifisch wirken und infolgedessen wichtige Funktionen in der Tumorabwehr übernehmen (Xu et al., 2020). Badoual et al. zeigten, dass HPV⁺-Tumore, die stark von PD1⁺-CD4⁺-T-Zellen und PD1⁺-CD8⁺-T-Zellen infiltriert sind, zu einem besseren Gesamtüberleben der Patienten führen. Auch unabhängig vom HPV-Tumorstatus der HNSCC-Patienten konnte eine positive Korrelation zwischen der Gesamtzahl der Infiltration durch PD1⁺-T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) und dem Gesamtüberleben über 18 Monate dargelegt werden (Badoual et al., 2013). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser und vieler weiterer Studien insgesamt daraufhin, dass PD1 als prognostischer Biomarker für ein günstiges Outcome von HNSCC-Patienten potenziell Anwendung im klinischen Alltag finden könnte.

Im Folgenden Abschnitt wird die prognostische Relevanz von TIM 3 als Surrogatmarker der T-Zellerschöpfung bei HNSCCs diskutiert, welcher ebenfalls als Immuncheckpoint fungiert und von CD8⁺-T-Zellen, Th1-Zellen, Th17-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird (Ganjlikhani Hakemi et al., 2020; Monney et al., 2002). Die immunsuppressive Wirkung von TIM 3 wird über seine verschiedenen Liganden, darunter C-Typ-Galektin-9, Phosphatidylserin, CEA Cell Adhesion Molecule 1 (CEACAM1) und High-Mobility-Group-Protein 1 vermittelt, wobei durch die Expression vom TIM 3 auf

aktivierten T-Zellen die Proliferation sowie die Produktion von Effektorzytokinen vermindert und die Apoptose von Effektor-T-Zellen gefördert wird (Yang et al., 2021). In einer Studie von Yang et al. wurde die immunhistochemische Expression von TIM 3 und CEACAM1 bei 80 HNSCC-Patienten untersucht und zusammen mit klinisch-pathologischen Parametern analysiert. Hierbei konnte mittels immunhistochemischem Nachweis TIM 3⁺-TILs und anschließender prognostischer Analysen nachgewiesen werden, dass eine geringe Infiltration mit TIM 3⁺-TILs signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert (Yang et al., 2021). Die Wechselwirkungen von TIM 3 und CEACAM1 bei HNSCCs wurden in dieser Studie ebenfalls untersucht und die Ergebnisse zeigten, dass es zu einer zusammenhängenden Koexpression beider Moleküle kommt, was darauf schließen lässt, dass TIM 3 gemeinsam mit CEACAM1 exprimiert wird und sie zusammen die T-Zellhemmung steuern. Huang et al. beschrieben, dass CEACAM1 in Form eines heterophilen Liganden für TIM 3 fungiert und notwendig für dessen Funktion ist, was in einer gemeinsamen Achse resultiert, die Immunantworten hemmen kann und infolgedessen tumorfördernde Wirkungen entfaltet (Y. H. Huang et al., 2015; Yang et al., 2021). Ähnliche Zusammenhänge bezüglich einer inversen Korrelation der TIM 3-Expression und dem Gesamtüberleben konnten auch in Studien bezüglich anderer Tumorentitäten, wie Karzinomen von Leber, Pankreas, Kolon und Magen nachgewiesen werden (F. Liu et al., 2018; Peng et al., 2017; Shen et al., 2016; Zhang et al., 2017). Eine Studie von Burugu et al. untersuchte die prognostische Bedeutung der TIM 3-Expression bei 3992 Brustkrebspatientinnen mittels Immunhistochemie und beschrieb Gegenteiliges, denn hier deutete die starke Expression von TIM 3⁺-TILs auf eine günstigere Prognose der betroffenen Patientinnen hin, was die Annahme unterstützt, dass TIM 3 als unabhängiger prognostischer Biomarker angenommen werden könnte, wobei die Frage nach wie vor ungeklärt ist ob eine gesteigerte TIM 3-Expression mit einem günstigen oder einem kürzeren Gesamtüberleben einhergeht (Burugu et al., 2018). Auch die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwiefern TIM 3 als prognostischer Biomarker für HNSCC-Patienten fungieren kann. Die Ergebnisse zeigten, dass HNSCC-Patienten mit einer stärkeren Infiltration durch TIM 3⁺-Immunzellen signifikant bessere Gesamtüberlebensdaten aufweisen, sowohl in der intratumoralen als auch in der peritumoralen Analyse. Die Studie von Yang et al. welche ebenfalls immunhistochemisch die TIM 3-Expression an HNSCC-Patienten nachgewiesen hat, zeigte gegenteilige Ergebnisse, jedoch gab es in den Versuchsabläufen (Inkubationszeiten, Demaskierung über Nacht), sowie in der Auswahl des Primärantikörpers deutliche Unterschiede (polyklonal), sodass Vergleiche beider Ergebnisse nur begrenzt möglich sind. Grundsätzlich bleibt somit die prognostische Relevanz von TIM 3 bei HNSCC-Patienten weiterhin umstritten und die heterogenen Ergebnisse vieler Studien unterstreichen die Wichtigkeit weiterer Forschungsarbeiten mit umfangreicheren Stichprobengrößen und

längerer Nachbeobachtungszeit, sowie systematischen Meta-Analysen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und weitere Studien zeigen allerdings, dass TIM 3 eine, wenn auch in der Richtung nicht klare prognostische Bedeutung bei HNSCCs besitzt. Darüber hinaus wird TIM 3 auch als therapeutische Zielstruktur von Immuncheckpoint-Inhibitoren immer mehr untersucht und Studien zeigten bereits, dass der Einsatz von TIM 3-Antikörpern bei HNSCC-Mausmodellen zu einer gesteigerten Funktion von CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen sowie zu einem Rückgang der Suppressorzellen führt, dadurch die Karzinogenese gehemmt und die Anti-Tumorantwort durch das Immunsystem gestärkt werden könnte (Liu et al., 2017).

LAG-3 ist ein weiterer Immuncheckpoint und Marker der T-Zellerschöpfung, welcher von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen exprimiert wird. LAG-3 reguliert die Proliferation von T-Zellen und hemmt durch die Bindung verschiedener Liganden die T-Zell-Aktivierung (Anderson et al., 2016; Mei et al., 2020; Shi et al., 2021). Darüber hinaus kommt es im Rahmen eines Infektions- oder Tumorgeschehens vor allem bei erschöpften und dysfunktionalen T-Zellen zu einer vermehrten Expression (Kisielow et al., 2005). Auch bei HNSCCs wurde bereits eine verstärkte LAG-3-Expression beschrieben, welche mit einem größeren Tumor, einem verstärkten Befall von Lymphknoten und einem höheren Tumorigrad assoziiert ist (Botticelli, Zizzari, et al., 2021). Auch die Studie von Deng et al. bestätigte diese Annahme und ergänzte, dass LAG-3 auf TILs bei HNSCCs gesteigert exprimiert wird. Da es sich bei LAG-3 um einen T-Zellerschöpfungsmarker handelt, gibt die gesteigerte Expression einen Hinweis auf dysfunktionale T-Zellen resultierend in einem immunsuppressiven Status bei HNSCCs (Deng et al., 2016). Dieser immungeschwächte Zustand in Verbindung mit erschöpften Effektor-T-Zellen könnte ein Grund dafür sein, dass sich der Tumor schneller ausbreitet, metastasiert und es zu höheren Rezidivraten kommt, obwohl nachweislich ausreichend T-Zellen peritumoral vorhanden sind (Camus et al., 2009). Ob die Expression von LAG-3 auch prognostische Aussagen über den klinischen Verlauf von HNSCC-Patienten erlaubt und LAG-3 somit als prognostischer Biomarker für HSNCCs genutzt werden kann, bleibt weiterhin nicht zweifelsfrei geklärt und es gibt zum aktuellen Zeitpunkt nur wenige Studien, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigt haben. Die Studie von Deng et al. untersuchte unter anderem die prognostische Aussagekraft der LAG-3-Expression von TILs bei HNSCCs und entdeckte, dass die Patienten mit einer hohen LAG-3-Expression im Vergleich zu denjenigen mit einer schwachen LAG-3-Expression, eine geringfügig bessere Gesamtüberlebensrate zeigten, wobei das Ergebnis statistisch nicht signifikant war. Zu den untersuchten humanen HNSCC-Gewebeproben zählten neben den primären HNSCCs auch Rezidive, metastasierte Lymphknoten, Dysplasien, HNSCCs mit Zustand nach Radiotherapie und/oder induktiver TPF-Chemotherapie, sowie normale Schleimhäute. Deng et al. konnten

in diesem Zusammenhang zusätzlich herausfinden, dass eine hohe Infiltration durch LAG-3⁺-Lymphozyten bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben zusammenhing (Deng et al., 2016). Multivariate Analysen bestätigten diese Annahme, indem sie die hohe Expression von LAG-3 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten bei primären HNSCC-Patienten mit negativem Lymphknotenstatus als unabhängigen prognostischen Faktor identifizierten (Deng et al., 2016). Dem Lymphknotenstatus scheint demnach eine entscheidende prognostische Rolle zuteil zu werden, welcher in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht differenziert in den Überlebensanalysen berücksichtigt wurde, sodass speziell dieser Einflussfaktor nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Pilotstudie von Botticelli et al. analysierte unter anderem die prognostische Aussagekraft von löslichem LAG-3 im peripheren Blut von HNSCC-Patienten und zeigte, dass lösliches LAG-3 scheinbar mit einer schlechten Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens bei HNSCCs zusammenhängt (Botticelli, Zizzari, et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die prognostische Relevanz des Immuncheckpoints LAG-3 untersucht, wobei die Ergebnisse zeigten, dass die HNSCC-Patienten mit einer starken Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen peritumoral ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben aufweisen als die HNSCC-Patienten mit einer schwachen peritumoralen Infiltration durch LAG-3⁺-Immunzellen. Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der bereits genannten Studien und hinsichtlich des Zusammenhangs der LAG-3-Expression mit der Prognose von HNSCC-Patienten teils widersprüchlichen Ergebnissen einzuordnen. Weitere Studien, die LAG-3 als potenziellen Prognosemarker im Rahmen von anderen Tumorentitäten untersuchten, zeigten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Beim kolorektalen Karzinom und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom war die LAG-3-Expression mit schlechten Gesamtüberlebensraten assoziiert, während sie beim Magenkarzinom wiederum als prognostisch günstiger Marker nachgewiesen wurde (Datar et al., 2019; Park et al., 2021; Xu et al., 2021). Die prognostische Relevanz von LAG-3 für humane Karzinome im Allgemeinen sowie für HNSCCs im Speziellen kann damit aufgrund sehr unterschiedlicher Ergebnisse der aktuellen Studienlage noch nicht sicher eingeordnet werden, was die Dringlichkeit weiterer Forschungen mit reproduzierbaren Studiendesigns und großen Patientenkollektiven unterstreicht. Dass es sich bei LAG-3 allerdings um eine wichtige molekulare Struktur im Kontext der Tumor-Immun-Interaktion handelt, zeigen nicht nur die vielen Studien bezüglich der Relevanz als prognostischer Marker, sondern auch die Forschungen von LAG-3 als potenzielle neue Zielstruktur von Immuncheckpoint-Blockaden (Hashemi-Sadraei et al., 2016).

9.6. Fazit und Ausblick

Die Tumormikroumgebung von HNSCCs ist ein hochkomplexes System und beeinflusst die Tumorzellbiologie und den klinischen Verlauf von HNSCC-Patienten erheblich, da sie durch verschiedenen Faktoren eine vorteilhafte Umgebung für den Tumor schafft (Giancotti, 2014). Eine HPV-Infektion sowie der Vitamin D-Status wurden als potenzielle Einflussfaktoren der Tumormikroumgebung in dieser Arbeit untersucht, indem die Abhängigkeit der Biomarker-Expression von HPV und Vitamin D immunhistochemisch analysiert wurde. Unsere Ergebnisse in Form von stärkeren Infiltrationen durch PD1⁺-Immunzellen und TIM 3⁺-Immunzellen bei HPV⁺-HNSCCs im Vergleich zu HPV⁻-HNSCCs deckte sich zu großen Teilen mit den Ergebnissen vieler anderer Studien (Krishna et al., 2018; Mueller & Ahmed, 2009). Dies kann zu weiteren Fragestellungen überleiten, die sich damit befassen sollten, inwiefern die genaue Identifikation der HNSCC-Immunlandschaft und HNSCC-Ätiologie Aufschlüsse darüber gibt, welche Therapieformen präferiert angewendet und welche prädiktiven Biomarker eingesetzt werden sollten. Die Ergebnisse des Einflusses vom Vitamin D-Status auf die Expression der Biomarker waren in dieser Arbeit statistisch nicht signifikant, jedoch zeigte sich ein Trend, welcher auf eine stärkere Infiltration durch PD1⁺-Immunzellen und TIM 3⁺-Immunzellen bei einem höheren Vitamin D-Spiegel des HNSCC-Patienten hindeutete. Auch diese Tendenz deckt sich mit den Ergebnissen vieler Studien, die Vitamin D als potenziellen Immunmodulator deuten, was in einem gestärkten Immunsystem resultieren kann (Bochen et al., 2018). Auch diese Ergebnisse können zu weiterführenden Studien führen, die sich noch gezielter mit dem Einfluss von Vitamin D auf die Expression weiterer Biomarker beschäftigen.

Schlussendlich stellen sich unter anderem die Fragen, inwiefern die untersuchten Biomarker der T-Zellerschöpfung und Stroma Seneszenz nicht nur als potenzielle prognostische Biomarker Eingang in die klinische Praxis finden könnten, sondern auch, inwiefern sie als potenzielle Zielstrukturen von neuen therapeutischen Ansätzen erforscht und angewendet werden können. Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen in Verbindung mit den statistischen Analysen und der Korrelation mit den klinisch-pathologischen Patientendaten diente in einem ersten Schritt dazu, die Komplexität und zelluläre Zusammensetzung der Tumormikroumgebung bei HNSCC-Patienten weiter zu charakterisieren und so die Einflüsse auf die Tumorzellbiologie und den klinischen Verlauf von Kopf-Hals-Tumorpatienten zu identifizieren.

Die Ergebnisse der Überlebensanalysen der Biomarker der T-Zellerschöpfung waren statistisch signifikant und deuten darauf hin, dass PD1, TIM 3 und LAG-3 prognostische Informationen über den klinischen Verlauf der untersuchten HNSCC-Patienten liefern

können, wobei sich insgesamt ein Zusammenhang einer gesteigerten T-Zellerschöpfung mit einer günstigeren Prognose der Patienten zeigte. Die prognostische Aussagekraft der Surrogatmarker der Stroma Seneszenz (IL-8, MMP3) hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht belegt werden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage gelingt in mehrfacher Hinsicht, jedoch gibt es weiterhin noch einige variierende Parameter bezüglich Patientenkollektiven, Versuchsbedingungen sowie statistischen Auswertungsanalysen, die auf noch offene Fragestellungen hinweisen. Perspektivisch könnten einzelne Einflussgrößen, wie der HPV- oder Lymphknotenstatus gezielt in Studien ein- oder ausgeschlossen werden, um die Unabhängigkeit der Surrogatmarker hervorzuheben. Des Weiteren könnte eine genauere Identifizierung und Klassifikation der Antikörper-positiven-Immunzellen hilfreich sein, um die prognostische Aussagekraft zu steigern und spezifischere therapeutische Zielstrukturen zu entdecken. Interessant könnten auch weitere Studien zu möglichen Wechselwirkungen der untersuchten Surrogatmarker mit ihren verschiedenen Liganden sein oder Beeinflussungen durch co-inhibitorische Rezeptoren. Im Allgemeinen würden größere Studien an umfangreicheren Patientenkollektiven mit balancierten Primärtumorlokalisationen und längeren Nachbeobachtungszeiten helfen, die Informationen und Aussagekraft der Surrogatmarker zu bestätigen, sodass sie zweifelsfrei im klinischen Alltag Anwendung finden können.

Auch die Forschung an neuen therapeutischen Zielstrukturen gewinnt zunehmend an Bedeutung, da die Überlebenschancen von HNSCC-Patienten trotz Fortschritten in der Therapie weiterhin noch sehr limitiert sind. Die Immuntherapie findet neben den etablierten Therapieformen zunehmend ihren Weg in das Behandlungsspektrum von HNSCCs, sodass zwei PD1-Antikörper (Pembrolizumab, Nivolumab) als Immuncheckpoint-Inhibitoren bereits Bestandteil der Therapieleitlinien von HNSCCs sind (Burtneß et al., 2019; Ferris et al., 2016). Zahlreiche weitere klinisch-immunonkologische Studien forschen derzeit an innovativen Einsatzmöglichkeiten für die Checkpoint-Inhibition bei HNSCC-Patienten (im Fall der HAWK-Studie der Anti-PD1-Antikörper Durvalumab) (Zandberg et al., 2019). Die Wechselwirkungen zwischen PD1 und seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 gelten in der Tumormikroumgebung von HNSCCs als wichtige Schlüsselemente für neue therapeutische Ansätze, da beispielsweise bereits bekannt ist, dass die PD1/PD-L1-Achse die Entstehung von HPV⁺-HNSCCs fördert (Lyford-Pike et al., 2013; Zandberg & Strome, 2014). In einer Phase-I/IIa-Studie wurde der Antikörper LAG-3 in Kombination mit Nivolumab bei Patienten mit rezidiviertem Melanom, die zuvor mit PD1-Antikörpern behandelt wurden, getestet (NCT01968109) und die 31 effektiv ausgewerteten Patienten zeigten eine 16%ige objektive Ansprechrate und eine 45%ige Krankheitskontrollrate (Ascierto et al., 2017). Die Phase-II-Studie TACTI-002 forscht derzeit an dem kombinierten Einsatz von löslichem LAG-3 und Pembrolizumab bei Patienten mit metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs

oder HNSCC in der Hoffnung, dass mithilfe der Kombinationstherapie eine stärkere Anti-Tumor-Immunantwort resultiert. Darüber hinaus wird in aktuell laufenden klinischen Studien der kombinierte Einsatz mehrerer Immuncheckpoint-Inhibitoren getestet, wie zum Beispiel die kombinierte Blockade von TIM 3 und PD-1/PD-L1 bei verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren (NCT02817633) oder der kombinierte Einsatz von PD1 und CTLA4 bei HNSCC-Patienten (NCT03019003) (Mei et al., 2020). Zusätzlich zu den Kombinationen mehrerer Immuncheckpoint-Inhibitoren wird der gemeinsame Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren und Chemotherapeutika sowie einer Strahlentherapie analysiert, um synergistische Effekte erkennen und diese potenziell zukünftig in der klinischen Praxis nutzen zu können.

Zusammengefasst zeigen damit sowohl die bereits gewonnenen Erkenntnisse als auch die laufenden Studien, dass das Potenzial immunonkologischer Biomarker noch lange nicht ausgeschöpft ist und Untersuchungen auf diesem Gebiet vielversprechende Aufschlüsse hinsichtlich einer optimierten Behandlungsstrategie von HNSCC-Patienten sowie einer besseren prognostischen Einschätzung geben können.

10. Literaturverzeichnis

1. Alspach, E., Fu, Y., & Stewart, S. A. (2013). Senescence and the pro-tumorigenic stroma. *Crit Rev Oncog*, 18(6), 549-558. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2014010630>
2. Anderson, A. C., Anderson, D. E., Bregoli, L., Hastings, W. D., Kassam, N., Lei, C., . . . Hafler, D. A. (2007). Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, 318(5853), 1141-1143. <https://doi.org/10.1126/science.1148536>
3. Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44(5), 989-1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
4. Andrae, S., Piras, F., Burdin, N., & Triebel, F. (2002). Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 168(8), 3874-3880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3874>
5. Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., . . . Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363(1), 24-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
6. Ao, T., Kikuta, J., & Ishii, M. (2021). The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/biom11111624>
7. Arellano-Garcia, M. E., Hu, S., Wang, J., Henson, B., Zhou, H., Chia, D., & Wong, D. T. (2008). Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral Dis*, 14(8), 705-712. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01488.x>
8. Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*, 56(1). <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
9. Aubert, R. D., Kamphorst, A. O., Sarkar, S., Vezys, V., Ha, S. J., Barber, D. L., . . . Ahmed, R. (2011). Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(52), 21182-21187. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118450109>
10. Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., . . . Tartour, E. (2013). PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*, 73(1), 128-138. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2606>

11. Baeke, F., Etten, E. V., Overbergh, L., & Mathieu, C. (2007). Vitamin D3 and the immune system: maintaining the balance in health and disease. *Nutr Res Rev*, *20*(1), 106-118. <https://doi.org/10.1017/S0954422407742713>
12. Baeke, F., Gysemans, C., Korf, H., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D insufficiency: implications for the immune system. *Pediatr Nephrol*, *25*(9), 1597-1606. <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1452-y>
13. Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *121*(1-2), 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.037>
14. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, *10*(4), 482-496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
15. Baggiolini, M., Walz, A., & Kunkel, S. L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*, *84*(4), 1045-1049. <https://doi.org/10.1172/JCI114265>
16. Bahrami, L. S., Ranjbar, G., Norouzy, A., & Arabi, S. M. (2020). Vitamin D supplementation effects on the clinical outcomes of patients with coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, *10*(1), 12923. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69762-w>
17. Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devèvre, E., Raghav, S. K., Legat, A., Barba, L., . . . Speiser, D. E. (2011). Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*, *121*(6), 2350-2360. <https://doi.org/10.1172/JCI46102>
18. Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., . . . Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682-687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
19. Beltra, J. C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M. S., Kurachi, M., Giles, J. R., Chen, Z., . . . Wherry, E. J. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8. *Immunity*, *52*(5), 825-841.e828. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.014>
20. Bendix, M., Greisen, S., Dige, A., Hvas, C. L., Bak, N., Jørgensen, S. P., . . . Agnholt, J. (2017). Vitamin D increases programmed death receptor-1 expression in Crohn's disease. *Oncotarget*, *8*(15), 24177-24186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15489>
21. Benoy, I. H., Salgado, R., Van Dam, P., Geboers, K., Van Marck, E., Scharpé, S., . . . Dirix, L. Y. (2004). Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*, *10*(21), 7157-7162. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0812>

22. Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefèbvre, J. L., Greiner, R. H., . . . 22931, E. O. f. R. a. T. o. C. T. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, *350*(19), 1945-1952. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032641>
23. Bhat, A. A., Yousuf, P., Wani, N. A., Rizwan, A., Chauhan, S. S., Siddiqi, M. A., . . . Macha, M. A. (2021). Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*, *6*(1), 12. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00419-w>
24. Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*, *34*(23-24), 1565-1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
25. Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., . . . Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*, *10*(1), 29-37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
26. Blank, C. U., Haining, W. N., Held, W., Hogan, P. G., Kallies, A., Lugli, E., . . . Zehn, D. (2019). Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol*, *19*(11), 665-674. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>
27. Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., & Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, *91*(1), 25-34. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)80006-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80006-4)
28. Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., . . . Fraumeni, J. F. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, *48*(11), 3282-3287.
29. Bochen, F., Balensiefer, B., Körner, S., Bittenbring, J. T., Neumann, F., Koch, A., . . . Linxweiler, M. (2018). Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function. *Oncoimmunology*, *7*(9), e1476817. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1476817>
30. Bonomi, M., Patsias, A., Posner, M., & Sikora, A. (2014). The role of inflammation in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol*, *816*, 107-127. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_5
31. Botticelli, A., Cirillo, A., Strigari, L., Valentini, F., Cerbelli, B., Scagnoli, S., . . . Marchetti, P. (2021). Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 in Head and Neck Cancer: A Network Meta-Analysis. *Front Immunol*, *12*, 705096. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705096>
32. Botticelli, A., Zizzari, I. G., Scagnoli, S., Pomati, G., Strigari, L., Cirillo, A., . . . Marchetti, P. (2021). The Role of Soluble LAG3 and Soluble Immune Checkpoints

- Profile in Advanced Head and Neck Cancer: A Pilot Study. *J Pers Med*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/jpm11070651>
33. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
 34. Brown, P. D. (2000). Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(9), 2167-2177. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.9.2167>
 35. Budimir, N., Thomas, G. D., Dolina, J. S., & Salek-Ardakani, S. (2022). Reversing T-cell Exhaustion in Cancer: Lessons Learned from PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res*, 10(2), 146-153. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-21-0515>
 36. Buleu, F. N., Luca, C. T., Tudor, A., Badalica-Petrescu, M., Caraba, A., Pah, A., . . . Dragan, S. (2019). Correlations between Vascular Stiffness Indicators, OPG, and 25-OH Vitamin D3 Status in Heart Failure Patients. *Medicina (Kaunas)*, 55(6). <https://doi.org/10.3390/medicina55060309>
 37. Burtneß, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., . . . Investigators, K.-. (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*, 394(10212), 1915-1928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7)
 38. Burugu, S., Gao, D., Leung, S., Chia, S. K., & Nielsen, T. O. (2018). TIM-3 expression in breast cancer. *Oncoimmunology*, 7(11), e1502128. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1502128>
 39. Calcinotto, A., & Alimonti, A. (2017). Aging tumour cells to cure cancer: "pro-senescence" therapy for cancer. *Swiss Med Wkly*, 147, w14367. <https://doi.org/10.4414/smw.2017.14367>
 40. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*, 99(2), 1047-1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>
 41. Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
 42. Camus, M., Tosolini, M., Mlecnik, B., Pagès, F., Kirilovsky, A., Berger, A., . . . Galon, J. (2009). Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res*, 69(6), 2685-2693. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2654>

43. Cantorna, M. T., Snyder, L., Lin, Y. D., & Yang, L. (2015). Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*, 7(4), 3011-3021. <https://doi.org/10.3390/nu7043011>
44. Chan, L. P., Wang, L. F., Chiang, F. Y., Lee, K. W., Kuo, P. L., & Liang, C. H. (2016). IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget*, 7(38), 61820-61831. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11445>
45. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., . . . Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29(32), 4294-4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
46. Chaturvedi, A. K., Graubard, B. I., Broutian, T., Pickard, R. K., Tong, Z. Y., Xiao, W., . . . Gillison, M. L. (2015). NHANES 2009-2012 Findings: Association of Sexual Behaviors with Higher Prevalence of Oral Oncogenic Human Papillomavirus Infections in U.S. Men. *Cancer Res*, 75(12), 2468-2477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2843>
47. Chaudhary, S., Ganguly, K., Muniyan, S., Pothuraju, R., Sayed, Z., Jones, D. T., . . . Macha, M. A. (2019). Immunometabolic Alterations by HPV Infection: New Dimensions to Head and Neck Cancer Disparity. *J Natl Cancer Inst*, 111(3), 233-244. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy207>
48. Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., & Lipsky, P. E. (2007). Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol*, 179(3), 1634-1647. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1634>
49. Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., . . . Bao, S. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, 153(1), 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.021>
50. Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. T., Chen, L. W., Kuo, S. F., Sun, C. C., . . . Chen, T. C. (2013). MART-10, a novel vitamin D analog, inhibits head and neck squamous carcinoma cells growth through cell cycle arrest at G₀/G₁ with upregulation of p21 and p27 and downregulation of telomerase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138, 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.002>
51. Chocarro de Erauso, L., Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Hernandez, C., Fernandez, G., . . . Escors, D. (2020). Resistance to PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy. A Tumor-Intrinsic or Tumor-Extrinsic Phenomenon? *Front Pharmacol*, 11, 441. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00441>
52. Chocarro, L., Blanco, E., Arasanz, H., Fernández-Rubio, L., Bocanegra, A., Echaide, M., . . . Escors, D. (2022). Clinical landscape of LAG-3-targeted therapy. *Immuno-oncol Technol*, 14, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.iotech.2022.100079>

53. Chung, C. H., Parker, J. S., Karaca, G., Wu, J., Funkhouser, W. K., Moore, D., . . . Perou, C. M. (2004). Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5(5), 489-500. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00112-6)
54. Cohen, E. E. W., Soulières, D., Le Tourneau, C., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M. J., . . . investigators, K.-. (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*, 393(10167), 156-167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8)
55. Collier, J. L., Weiss, S. A., Pauken, K. E., Sen, D. R., & Sharpe, A. H. (2021). Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8. *Nat Immunol*, 22(7), 809-819. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00949-7>
56. Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., . . . 9501/Intergroup, R. T. O. G. (2004). Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 350(19), 1937-1944. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032646>
57. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
58. Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., . . . Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6(12), 2853-2868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
59. Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, 11(5), 1921-1929. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05245.x>
60. Courtois-Cox, S., Jones, S. L., & Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 27(20), 2801-2809. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210950>
61. Coussens, L. M., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295(5564), 2387-2392. <https://doi.org/10.1126/science.1067100>
62. Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E., & Wherry, E. J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*, 40(2), 289-302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.005>

63. Crawford, A., & Wherry, E. J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol*, 21(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.010>
64. Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., . . . Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*, 9(5), 562-567. <https://doi.org/10.1038/nm863>
65. Curry, J. M., Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad, V., Pribitkin, E., & Tuluc, M. (2014). Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*, 41(2), 217-234. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.003>
66. Curtin, J. F., Liu, N., Candolfi, M., Xiong, W., Assi, H., Yagiz, K., . . . Castro, M. G. (2009). HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med*, 6(1), e10. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000010>
67. D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., . . . Gillison, M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 356(19), 1944-1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
68. Dardalhon, V., Anderson, A. C., Karman, J., Apetoh, L., Chandwaskar, R., Lee, D. H., . . . Kuchroo, V. K. (2010). Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol*, 185(3), 1383-1392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903275>
69. Datar, I., Sanmamed, M. F., Wang, J., Henick, B. S., Choi, J., Badri, T., . . . Schalper, K. A. (2019). Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non-Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis. *Clin Cancer Res*, 25(15), 4663-4673. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4142>
70. Davaapil, H., Brockes, J. P., & Yun, M. H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development*, 144(1), 106-114. <https://doi.org/10.1242/dev.138222>
71. Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., . . . Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*, 7(2), 165-176. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>
72. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., . . . Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>

73. Deng, L., Mi, J., Ruan, X., Zhang, G., Pan, Y., & Wang, R. (2022). Identification and Analysis of Senescence-Related Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by a Comprehensive Bioinformatics Approach. *Mediators Inflamm*, 2022, 4007469. <https://doi.org/10.1155/2022/4007469>
74. Deng, W. W., Mao, L., Yu, G. T., Bu, L. L., Ma, S. R., Liu, B., . . . Sun, Z. J. (2016). LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*, 5(11), e1239005. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1239005>
75. Denton, A. E., Roberts, E. W., & Fearon, D. T. (2018). Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 1060, 99-114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_6
76. Dobrenis, K., Gauthier, L. R., Barroca, V., & Magnon, C. (2015). Granulocyte colony-stimulating factor off-target effect on nerve outgrowth promotes prostate cancer development. *Int J Cancer*, 136(4), 982-988. <https://doi.org/10.1002/ijc.29046>
77. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5(12), 1365-1369. <https://doi.org/10.1038/70932>
78. Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., & Fidler, I. J. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 88(6), 801-810. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81926-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81926-1)
79. Egeblad, M., Nakasone, E. S., & Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, 18(6), 884-901. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>
80. Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3), 161-174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
81. Engelsen, O., Brustad, M., Aksnes, L., & Lund, E. (2005). Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover, aerosols and cloud thickness. *Photochem Photobiol*, 81(6), 1287-1290. <https://doi.org/10.1562/2004-11-19-RN-375>
82. Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst*, 102(20), 1536-1546. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>
83. Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., . . . Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100(4), 261-269. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn011>

84. Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J. B., & Chilliard, Y. (2006). Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *J Dairy Sci*, *89*(10), 4026-4041. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72446-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72446-8)
85. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., . . . Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, *144*(8), 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
86. Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., . . . Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*, *375*(19), 1856-1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>
87. Ferris, R. L., Licitra, L., Fayette, J., Even, C., Blumenschein, G., Harrington, K. J., . . . Gillison, M. L. (2019). Nivolumab in Patients with Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Efficacy and Safety in CheckMate 141 by Prior Cetuximab Use. *Clin Cancer Res*, *25*(17), 5221-5230. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3944>
88. Forastiere, A. A., Ismaila, N., Lewin, J. S., Nathan, C. A., Adelstein, D. J., Eisbruch, A., . . . Wolf, G. T. (2018). Use of Larynx-Preservation Strategies in the Treatment of Laryngeal Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, *36*(11), 1143-1169. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.7385>
89. Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., . . . Zarour, H. M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med*, *207*(10), 2175-2186. <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>
90. Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Chauvin, J. M., Sander, C., Janjic, B., . . . Zarour, H. M. (2014). PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Res*, *74*(4), 1045-1055. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2908>
91. Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., . . . Zarour, H. M. (2012). CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res*, *72*(4), 887-896. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2637>
92. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., . . . Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7

- family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
93. Freije, J. M., Balbín, M., Pendás, A. M., Sánchez, L. M., Puente, X. S., & López-Otín, C. (2003). Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol*, 532, 91-107. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0081-0_9
94. Fuller, M. J., Khanolkar, A., Tebo, A. E., & Zajac, A. J. (2004). Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J Immunol*, 172(7), 4204-4214. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4204>
95. Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14(10), 1014-1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
96. Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Plückerthun, A., Elliott, T., . . . Zinkernagel, R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*, 187(9), 1383-1393. <https://doi.org/10.1084/jem.187.9.1383>
97. Gameiro, S. F., Ghasemi, F., Barrett, J. W., Koropatnick, J., Nichols, A. C., Mymryk, J. S., & Maleki Vareki, S. (2018). Treatment-naïve HPV+ head and neck cancers display a T-cell-inflamed phenotype distinct from their HPV- counterparts that has implications for immunotherapy. *Oncoimmunology*, 7(10), e1498439. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1498439>
98. Ganjalikhani Hakemi, M., Jafarinia, M., Azizi, M., Rezaeepoor, M., Isayev, O., & Bazhin, A. V. (2020). The Role of TIM-3 in Hepatocellular Carcinoma: A Promising Target for Immunotherapy? *Front Oncol*, 10, 601661. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.601661>
99. Gao, X., Zhu, Y., Li, G., Huang, H., Zhang, G., Wang, F., . . . Lu, B. (2012). TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One*, 7(2), e30676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030676>
100. Geldmeyer-Hilt, K., Heine, G., Hartmann, B., Baumgrass, R., Radbruch, A., & Worm, M. (2011). 1,25-dihydroxyvitamin D3 impairs NF-κB activation in human naïve B cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 407(4), 699-702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.078>
101. Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*, 278(1), 16-27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>

102. Giacotti, F. G. (2014). Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett*, *588*(16), 2558-2570. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.005>
103. Gillison, M. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., . . . Ferris, R. L. (2022). Long-term Outcomes with Nivolumab as First-line Treatment in Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer: Subgroup Analysis of CheckMate 141. *Oncologist*, *27*(2), e194-e198. <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyab036>
104. Gillison, M. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., . . . Ferris, R. L. (2018). CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. *Oncologist*, *23*(9), 1079-1082. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0674>
105. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, *33*(29), 3235-3242. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995>
106. Glück, S., Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T. W., Schmacke, N. A., . . . Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol*, *19*(9), 1061-1070. <https://doi.org/10.1038/ncb3586>
107. Gobin, E., Bagwell, K., Wagner, J., Mysona, D., Sandirasegarane, S., Smith, N., . . . She, J. X. (2019). A pan-cancer perspective of matrix metalloproteinases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer*, *19*(1), 581. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5768-0>
108. Gohji, K., Fujimoto, N., Komiyama, T., Fujii, A., Ohkawa, J., Kamidono, S., & Nakajima, M. (1996). Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer*, *78*(11), 2379-2387.
109. Goldberg, M. V., & Drake, C. G. (2011). LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol*, *344*, 269-278. https://doi.org/10.1007/82_2010_114
110. Gonçalves Silva, I., Yasinska, I. M., Sakhnevych, S. S., Fiedler, W., Wellbrock, J., Bardelli, M., . . . Sumbayev, V. V. (2017). The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine*, *22*, 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.018>
111. Gray-Owen, S. D., & Blumberg, R. S. (2006). CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, *6*(6), 433-446. <https://doi.org/10.1038/nri1864>
112. Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, *23*, 515-548. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>

113. Guha, N., Boffetta, P., Wünsch Filho, V., Eluf Neto, J., Shangina, O., Zaridze, D., . . . Brennan, P. (2007). Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*, *166*(10), 1159-1173. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm193>
114. Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., & Triebel, F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol*, *161*(8), 4058-4065.
115. Hari, P., Millar, F. R., Tarrats, N., Birch, J., Quintanilla, A., Rink, C. J., . . . Acosta, J. C. (2019). The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Adv*, *5*(6), eaaw0254. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw0254>
116. Hart, P. H., Gorman, S., & Finlay-Jones, J. J. (2011). Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol*, *11*(9), 584-596. <https://doi.org/10.1038/nri3045>
117. Hashemi-Sadraei, N., Sikora, A. G., & Brizel, D. M. (2016). Immunotherapy and Checkpoint Inhibitors in Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, *35*, e277-282. https://doi.org/10.14694/EDBK_157801
118. HAYFLICK, L., & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
119. He, Y., Cao, J., Zhao, C., Li, X., Zhou, C., & Hirsch, F. R. (2018). TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther*, *11*, 7005-7009. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170385>
120. Heine, G., Niesner, U., Chang, H. D., Steinmeyer, A., Zügel, U., Zuberbier, T., . . . Worm, M. (2008). 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol*, *38*(8), 2210-2218. <https://doi.org/10.1002/eji.200838216>
121. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, *28*(6), 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
122. Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S. V., Evans, K. N., Bland, R., Eliopoulos, A. G., . . . Chakraverty, R. (2003). Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, *170*(11), 5382-5390. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5382>
123. Hintzpeter, B., Mensink, G. B., Thierfelder, W., Müller, M. J., & Scheidt-Nave, C. (2008). Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr*, *62*(9), 1079-1089. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602825>

124. Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., . . . Chen, L. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*, *65*(3), 1089-1096.
125. Hoare, M., Ito, Y., Kang, T. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., . . . Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol*, *18*(9), 979-992. <https://doi.org/10.1038/ncb3397>
126. Holick, M. F. (2004a). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, *80*(6 Suppl), 1678S-1688S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1678S>
127. Holick, M. F. (2004b). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*, *79*(3), 362-371. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.362>
128. Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, *357*(3), 266-281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
129. Hu, P., Wang, G., Shen, M., Zhang, P., Zhang, J., Du, J., & Liu, Q. (2015). Intratumoral polymorphonuclear granulocyte is associated with poor prognosis in squamous esophageal cancer by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Future Oncol*, *11*(5), 771-783. <https://doi.org/10.2217/fon.14.306>
130. Huang, J. F., Du, W. X., & Chen, J. J. (2016). Elevated expression of matrix metalloproteinase-3 in human osteosarcoma and its association with tumor metastasis. *J BUON*, *21*(5), 1279-1286.
131. Huang, S. H., Xu, W., Waldron, J., Siu, L., Shen, X., Tong, L., . . . O'Sullivan, B. (2015). Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *J Clin Oncol*, *33*(8), 836-845. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.6412>
132. Huang, Y. H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A. C., Gandhi, A., Russell, A., . . . Blumberg, R. S. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*, *517*(7534), 386-390. <https://doi.org/10.1038/nature13848>
133. Huard, B., Gaulard, P., Faure, F., Hercend, T., & Triebel, F. (1994). Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics*, *39*(3), 213-217. <https://doi.org/10.1007/BF00241263>
134. Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D., & Triebel, F. (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol*, *25*(9), 2718-2721. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250949>

135. Hwang, S., Cobb, D. A., Bhadra, R., Youngblood, B., & Khan, I. A. (2016). Blimp-1-mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. *J Exp Med*, 213(9), 1799-1818. <https://doi.org/10.1084/jem.20151995>
136. Hyppönen, E., & Power, C. (2007). Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr*, 85(3), 860-868. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.860>
137. Iizuka, S., Ishimaru, N., & Kudo, Y. (2014). Matrix metalloproteinases: the gene expression signatures of head and neck cancer progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 396-415. <https://doi.org/10.3390/cancers6010396>
138. Iouzalen, N., Andrae, S., Hannier, S., & Triebel, F. (2001). LAP, a lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-associated protein that binds to a repeated EP motif in the intracellular region of LAG-3, may participate in the down-regulation of the CD3/TCR activation pathway. *Eur J Immunol*, 31(10), 2885-2891. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10<2885::aid-immu2885>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2885::aid-immu2885>3.0.co;2-2)
139. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12293-12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
140. Iwai, Y., Terawaki, S., & Honjo, T. (2005). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*, 17(2), 133-144. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh194>
141. Iyer, N. G., Tan, D. S., Tan, V. K., Wang, W., Hwang, J., Tan, N. C., . . . Tan, E. H. (2015). Randomized trial comparing surgery and adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year update and subset analysis. *Cancer*, 121(10), 1599-1607. <https://doi.org/10.1002/cncr.29251>
142. Jeffery, L. E., Burke, F., Mura, M., Zheng, Y., Qureshi, O. S., Hewison, M., . . . 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. *J Immunol*, 183(9), 5458-5467. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803217>
143. Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ferrari, P., van Duijnhoven, F. J., Norat, T., Pischon, T., . . . Riboli, E. (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ*, 340, b5500. <https://doi.org/10.1136/bmj.b5500>
144. Jeon, I. S., Kim, H. R., Shin, E. Y., Kim, E. G., Han, H. S., Hong, J. T., . . . Choi, J. K. (2018). Modulation of store-operated calcium entry and nascent adhesion by p21-

- activated kinase 1. *Exp Mol Med*, 50(5), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0093-2>
145. Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*, 6, e1792. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
146. Jin, H. T., Anderson, A. C., Tan, W. G., West, E. E., Ha, S. J., Araki, K., . . . Ahmed, R. (2010). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33), 14733-14738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009731107>
147. Jing, W., Gershan, J. A., Weber, J., Tlomak, D., McOlash, L., Sabatos-Peyton, C., & Johnson, B. D. (2015). Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J Immunother Cancer*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40425-014-0043-z>
148. Jobin, P. G., Butler, G. S., & Overall, C. M. (2017). New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(11 Pt A), 2043-2055. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.013>
149. Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
150. Johnson, S. D., De Costa, A. M., & Young, M. R. (2014). Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*, 6(2), 756-770. <https://doi.org/10.3390/cancers6020756>
151. Ju, Y., Shang, X., Liu, Z., Zhang, J., Li, Y., Shen, Y., . . . Zou, J. (2014). The Tim-3/galectin-9 pathway involves in the homeostasis of hepatic Tregs in a mouse model of concanavalin A-induced hepatitis. *Mol Immunol*, 58(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.001>
152. Kaltenmeier, C., Yazdani, H. O., Morder, K., Geller, D. A., Simmons, R. L., & Tohme, S. (2021). Neutrophil Extracellular Traps Promote T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 12, 785222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.785222>
153. Kang, C. W., Dutta, A., Chang, L. Y., Mahalingam, J., Lin, Y. C., Chiang, J. M., . . . Lin, C. Y. (2015). Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci Rep*, 5, 15659. <https://doi.org/10.1038/srep15659>
154. Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M., & Barnes, P. J. (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 153(2), 530-534. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.2.8564092>

155. Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, *141*(1), 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
156. Khairnar, V., Duhan, V., Patil, A. M., Zhou, F., Bhat, H., Thoens, C., . . . Lang, K. S. (2018). CEACAM1 promotes CD8. *Nat Commun*, *9*(1), 2561. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04832-2>
157. Kikushige, Y., Miyamoto, T., Yuda, J., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Shima, T., Takayanagi, S., . . . Akashi, K. (2015). A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell*, *17*(3), 341-352. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.011>
158. Kisielow, M., Kisielow, J., Capoferri-Sollami, G., & Karjalainen, K. (2005). Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*, *35*(7), 2081-2088. <https://doi.org/10.1002/eji.200526090>
159. Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., . . . Tachezy, R. (2013). Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer*, *133*(8), 1832-1839. <https://doi.org/10.1002/ijc.28194>
160. Krishna, S., Ulrich, P., Wilson, E., Parikh, F., Narang, P., Yang, S., . . . Anderson, K. S. (2018). Human Papilloma Virus Specific Immunogenicity and Dysfunction of CD8. *Cancer Res*, *78*(21), 6159-6170. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0163>
161. Kurahara, S., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Beppu, M., Hiraki, A., . . . Shirasuna, K. (1999). Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, *21*(7), 627-638. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0347\(199910\)21:7<627::aid-hed7>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0347(199910)21:7<627::aid-hed7>3.0.co;2-2)
162. Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., . . . Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, *2*(3), 261-268. <https://doi.org/10.1038/85330>
163. Lechner, M., Liu, J., Masterson, L., & Fenton, T. R. (2022). HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol*, *19*(5), 306-327. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00603-7>
164. Lee, N. C. J., Kelly, J. R., Park, H. S., An, Y., Judson, B. L., Burtness, B. A., & Husain, Z. A. (2018). Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*, *85*, 35-39. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.001>
165. 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. *J Clin Invest*, 74(2), 657-661. <https://doi.org/10.1172/JCI111465>
166. Li, P., Zhu, X., Cao, G., Wu, R., Li, K., Yuan, W., . . . Gao, Y. (2022). 1 α ,25(OH). *J Immunother Cancer*, 10(3). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003477>
167. Li, Q., Skinner, P. J., Ha, S. J., Duan, L., Mattila, T. L., Hage, A., . . . Haase, A. T. (2009). Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science*, 323(5922), 1726-1729. <https://doi.org/10.1126/science.1168676>
168. Li, X. J., Peng, L. X., Shao, J. Y., Lu, W. H., Zhang, J. X., Chen, S., . . . Qian, C. N. (2012). As an independent unfavorable prognostic factor, IL-8 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. *Carcinogenesis*, 33(7), 1302-1309. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs181>
169. Liang, M., Wang, J., Wu, C., Wu, M., Hu, J., Dai, J., . . . Dong, C. (2021). Targeting matrix metalloproteinase MMP3 greatly enhances oncolytic virus mediated tumor therapy. *Transl Oncol*, 14(12), 101221. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101221>
170. Lichtenegger, F. S., Rothe, M., Schnorfeil, F. M., Deiser, K., Krupka, C., Augsberger, C., . . . Subklewe, M. (2018). Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol*, 9, 385. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00385>
171. Lijnen, H. R., Ugwu, F., Bini, A., & Collen, D. (1998). Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry*, 37(14), 4699-4702. <https://doi.org/10.1021/bi9731798>
172. Lin, R., Nagai, Y., Sladek, R., Bastien, Y., Ho, J., Petrecca, K., . . . White, J. H. (2002). Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol*, 16(6), 1243-1256. <https://doi.org/10.1210/mend.16.6.0874>
173. Lino, A. C., Dang, V. D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., . . . Fillatreau, S. (2018). LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity*, 49(1), 120-133.e129. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.007>
174. Liotta, L. A. (1986). Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res*, 46(1), 1-7.
175. Liotta, L. A., & Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835), 375-379. <https://doi.org/10.1038/35077241>

176. Liu, F., Liu, Y., & Chen, Z. (2018). Tim-3 expression and its role in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*, *11*(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0667-4>
177. Liu, J., Zhang, S., Hu, Y., Yang, Z., Li, J., Liu, X., . . . Lu, X. (2016). Targeting PD-1 and Tim-3 Pathways to Reverse CD8 T-Cell Exhaustion and Enhance Ex Vivo T-Cell Responses to Autologous Dendritic/Tumor Vaccines. *J Immunother*, *39*(4), 171-180. <https://doi.org/10.1097/CJI.000000000000122>
178. Liu, J. F., Ma, S. R., Mao, L., Bu, L. L., Yu, G. T., Li, Y. C., . . . Sun, Z. J. (2017). T-cell immunoglobulin mucin 3 blockade drives an antitumor immune response in head and neck cancer. *Mol Oncol*, *11*(2), 235-247. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12029>
179. Liu, J. F., Wu, L., Yang, L. L., Deng, W. W., Mao, L., Wu, H., . . . Sun, Z. J. (2018). Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, *37*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0713-7>
180. Lucas, J. A., Menke, J., Rabacal, W. A., Schoen, F. J., Sharpe, A. H., & Kelley, V. R. (2008). Programmed death ligand 1 regulates a critical checkpoint for autoimmune myocarditis and pneumonitis in MRL mice. *J Immunol*, *181*(4), 2513-2521. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2513>
181. Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G. D., Taube, J. M., Westra, W. H., Akpeng, B., . . . Pai, S. I. (2013). Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, *73*(6), 1733-1741. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2384>
182. Maeda, T. K., Sugiura, D., Okazaki, I. M., Maruhashi, T., & Okazaki, T. (2019). Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *J Biol Chem*, *294*(15), 6017-6026. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007455>
183. Mahal, B. A., Catalano, P. J., Haddad, R. I., Hanna, G. J., Kass, J. I., Schoenfeld, J. D., . . . Margalit, D. N. (2019). Incidence and Demographic Burden of HPV-Associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *28*(10), 1660-1667. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0038>
184. Mahon, B. D., Wittke, A., Weaver, V., & Cantorna, M. T. (2003). The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem*, *89*(5), 922-932. <https://doi.org/10.1002/jcb.10580>
185. Mandal, R., Şenbabaoğlu, Y., Desrichard, A., Havel, J. J., Dalin, M. G., Riaz, N., . . . Morris, L. G. (2016). The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*, *1*(17), e89829. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>

186. Matrisian, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 14(7), 455-463. <https://doi.org/10.1002/bies.950140705>
187. Matrisian, L. M., Sledge, G. W., & Mohla, S. (2003). Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res*, 63(19), 6105-6109.
188. Matsuzaki, J., Gnjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., . . . Odunsi, K. (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(17), 7875-7880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003345107>
189. Maçon-Lemaître, L., & Triebel, F. (2005). The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology*, 115(2), 170-178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02145.x>
190. Mei, Z., Huang, J., Qiao, B., & Lam, A. K. (2020). Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*, 12(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0084-8>
191. Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer*, 135(7), 1653-1661. <https://doi.org/10.1002/ijc.28811>
192. Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Lorrey, S. J., Srinivasan, E. S., Waibl-Polania, J., Wilkinson, D. S., & Fecci, P. E. (2021). CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? *Clin Cancer Res*, 27(21), 5742-5752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0206>
193. Miller, B. C., Sen, D. R., Al Abosy, R., Bi, K., Virkud, Y. V., LaFleur, M. W., . . . Haining, W. N. (2019). Subsets of exhausted CD8. *Nat Immunol*, 20(3), 326-336. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>
194. Mishra, A., & Meherotra, R. (2014). Head and neck cancer: global burden and regional trends in India. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2), 537-550. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.2.537>
195. Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., . . . Kuchroo, V. K. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415(6871), 536-541. <https://doi.org/10.1038/415536a>
196. Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., & Zinkernagel, R. M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*, 362(6422), 758-761. <https://doi.org/10.1038/362758a0>

197. Mozos, I., & Marginean, O. (2015). Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*, 2015, 109275. <https://doi.org/10.1155/2015/109275>
198. Mueller, S. N., & Ahmed, R. (2009). High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8623-8628. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809818106>
199. Mukherjee, G., Bag, S., Chakraborty, P., Dey, D., Roy, S., Jain, P., . . . Dutt, S. (2020). Density of CD3+ and CD8+ cells in gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastases and survival. *PLoS One*, 15(11), e0242058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242058>
200. Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., . . . Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
201. Myers, J. N., Greenberg, J. S., Mo, V., & Roberts, D. (2001). Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*, 92(12), 3030-3036. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011215\)92:12<3030::aid-cnrc10148>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011215)92:12<3030::aid-cnrc10148>3.0.co;2-p)
202. Nagasaki, J., & Togashi, Y. (2022). A variety of 'exhausted' T cells in the tumor microenvironment. *Int Immunol*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac013>
203. Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
204. Nagata, M., Fujita, H., Ida, H., Hoshina, H., Inoue, T., Seki, Y., . . . Takagi, R. (2003). Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer*, 106(5), 683-689. <https://doi.org/10.1002/ijc.11283>
205. Ndhlovu, L. C., Lopez-Vergès, S., Barbour, J. D., Jones, R. B., Jha, A. R., Long, B. R., . . . Lanier, L. L. (2012). Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood*, 119(16), 3734-3743. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392951>
206. Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsagué, X., Laporte, L., . . . Trottier, H. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 15(12), 1319-1331. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70471-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70471-1)

207. Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, *18*(5), 1135-1149. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.5.1135>
208. Network, C. G. A. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, *517*(7536), 576-582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
209. Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Kähäri, V. M., & Pyrhönen, S. (2002). High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer*, *97*(4), 432-438. <https://doi.org/10.1002/ijc.1636>
210. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, *11*(2), 141-151. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80089-8)
211. Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., . . . Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, *291*(5502), 319-322. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.319>
212. Näsman, A., Romanitan, M., Nordfors, C., Grün, N., Johansson, H., Hammarstedt, L., . . . Ramqvist, T. (2012). Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One*, *7*(6), e38711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038711>
213. Oft, M., Heider, K. H., & Beug, H. (1998). TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*, *8*(23), 1243-1252. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00533-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00533-7)
214. Overall, C. M., & López-Otín, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, *2*(9), 657-672. <https://doi.org/10.1038/nrc884>
215. Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(3), 221-233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
216. Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*, *4*, 49-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>
217. Park, Y., Seo, A. N., Koh, J., Nam, S. K., Kwak, Y., Ahn, S. H., . . . Lee, H. S. (2021). Expression of the immune checkpoint receptors PD-1, LAG3, and TIM3 in the immune context of stage II and III gastric cancer by using single and chromogenic

- multiplex immunohistochemistry. *Oncoimmunology*, 10(1), 1954761. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1954761>
218. Parker, J., Hashmi, O., Dutton, D., Mavrodaris, A., Stranges, S., Kandala, N. B., . . . Franco, O. H. (2010). Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, 65(3), 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.12.013>
219. Parks, W. C., Wilson, C. L., & López-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 4(8), 617-629. <https://doi.org/10.1038/nri1418>
220. Patterson, B. C., & Sang, Q. A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*, 272(46), 28823-28825. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28823>
221. Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol*, 36(4), 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>
222. Peltanova, B., Raudenska, M., & Masarik, M. (2019). Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*, 18(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0983-5>
223. Peng, P. J., Li, Y., & Sun, S. (2017). On the significance of Tim-3 expression in pancreatic cancer. *Saudi J Biol Sci*, 24(8), 1754-1757. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.006>
224. Phong, B. L., Avery, L., Sumpter, T. L., Gorman, J. V., Watkins, S. C., Colgan, J. D., & Kane, L. P. (2015). Tim-3 enhances FcεRI-proximal signaling to modulate mast cell activation. *J Exp Med*, 212(13), 2289-2304. <https://doi.org/10.1084/jem.20150388>
225. Pincikova, T., Paquin-Proulx, D., Sandberg, J. K., Flodström-Tullberg, M., & Hjelte, L. (2017). Vitamin D treatment modulates immune activation in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol*, 189(3), 359-371. <https://doi.org/10.1111/cei.12984>
226. Pokrývková, B., Grega, M., Klozar, J., Vencálek, O., Nunvář, J., & Tachezy, R. (2022). PD1. *Biomedicines*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112794>
227. Poropatich, K., Hernandez, D., Fontanarosa, J., Brown, K., Woloschak, G., Paintal, A., . . . Samant, S. (2017). Peritumoral cuffing by T-cell tumor-infiltrating lymphocytes distinguishes HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma from oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 46(10), 972-978. <https://doi.org/10.1111/jop.12605>
228. Prieto, L. I., & Baker, D. J. (2019). Cellular Senescence and the Immune System in Cancer. *Gerontology*, 65(5), 505-512. <https://doi.org/10.1159/000500683>

229. Provedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deftos, L. J., & Manolagas, S. C. (1983). 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, *221*(4616), 1181-1183. <https://doi.org/10.1126/science.6310748>
230. Punyani, S. R., & Sathawane, R. S. (2013). Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig*, *17*(2), 517-524. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0723-3>
231. Pynnonen, M. A., Gillespie, M. B., Roman, B., Rosenfeld, R. M., Tunkel, D. E., Bontempo, L., . . . Corrigan, M. D. (2017). Clinical Practice Guideline: Evaluation of the Neck Mass in Adults. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *157*(2_suppl), S1-S30. <https://doi.org/10.1177/0194599817722550>
232. Pérez-Mancera, P. A., Young, A. R., & Narita, M. (2014). Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat Rev Cancer*, *14*(8), 547-558. <https://doi.org/10.1038/nrc3773>
233. Quan, H., Shan, Z., Liu, Z., Liu, S., Yang, L., Fang, X., . . . Fang, L. (2020). The repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes within the microenvironment of oral squamous cell carcinoma reveals immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother*, *69*(3), 465-476. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02479-x>
234. Quezada, S. A., Peggs, K. S., Simpson, T. R., & Allison, J. P. (2011). Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*, *241*(1), 104-118. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x>
235. Rabenberg, M., Scheidt-Nave, C., Busch, M. A., Rieckmann, N., Hintzpeter, B., & Mensink, G. B. (2015). Vitamin D status among adults in Germany--results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health*, *15*, 641. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-2016-7>
236. Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, *8*(3), 138-140.
237. Rischin, D., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., . . . Burtness, B. (2022). Pembrolizumab alone or with chemotherapy for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Health-related quality-of-life results from KEYNOTE-048. *Oral Oncol*, *128*, 105815. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105815>
238. Rotnáglová, E., Tachezy, R., Saláková, M., Procházka, B., Koš'abová, E., Veselá, E., . . . Klozar, J. (2011). HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer*, *129*(1), 101-110. <https://doi.org/10.1002/ijc.25889>

239. Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A. H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., . . . Stewart, S. A. (2016). Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun*, 7, 11762. <https://doi.org/10.1038/ncomms11762>
240. Sabatos-Peyton, C. A., Nevin, J., Brock, A., Venable, J. D., Tan, D. J., Kassam, N., . . . Anderson, A. C. (2018). Blockade of Tim-3 binding to phosphatidylserine and CEACAM1 is a shared feature of anti-Tim-3 antibodies that have functional efficacy. *Oncoimmunology*, 7(2), e1385690. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1385690>
241. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*, 207(10), 2187-2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
242. Sakuishi, K., Ngiow, S. F., Sullivan, J. M., Teng, M. W., Kuchroo, V. K., Smyth, M. J., & Anderson, A. C. (2013). TIM3. *Oncoimmunology*, 2(4), e23849. <https://doi.org/10.4161/onci.23849>
243. Sauer, N., Szlasa, W., Jonderko, L., Oślizło, M., Kunachowicz, D., Kulbacka, J., & Karłowicz-Bodalska, K. (2022). LAG-3 as a Potent Target for Novel Anticancer Therapies of a Wide Range of Tumors. *Int J Mol Sci*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms23179958>
244. Schmezer, P., & Plass, C. (2008). [Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck]. *HNO*, 56(6), 594-602. <https://doi.org/10.1007/s00106-008-1720-3>
245. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
246. Schöffski, P., Tan, D. S. W., Martín, M., Ochoa-de-Olza, M., Sarantopoulos, J., Carvajal, R. D., . . . Hong, D. S. (2022). Phase I/II study of the LAG-3 inhibitor ieramilimab (LAG525) ± anti-PD-1 spartalizumab (PDR001) in patients with advanced malignancies. *J Immunother Cancer*, 10(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003776>
247. Seiwert, T. Y., Burtneß, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., . . . Chow, L. Q. (2016). Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*, 17(7), 956-965. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30066-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30066-3)
248. Shalinsky, D. R., Brekken, J., Zou, H., McDermott, C. D., Forsyth, P., Edwards, D., . . . Appelt, K. (1999). Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Ann N Y Acad Sci*, 878, 236-270. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07689.x>

249. Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*, 18(3), 153-167. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>
250. Sheikh, V., Kasapoglu, P., Zamani, A., Basiri, Z., Tahamoli-Roudsari, A., & Alahgholi-Hajibehzad, M. (2018). Vitamin D3 inhibits the proliferation of T helper cells, downregulate CD4. *Hum Immunol*, 79(6), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.03.001>
251. Shen, P., Yue, R., Tang, J., Si, H., Shen, L., Guo, C., . . . Song, Z. (2016). Preferential Tim-3 expression on Treg and CD8(+) T cells, supported by tumor-associated macrophages, is associated with worse prognosis in gastric cancer. *Am J Transl Res*, 8(8), 3419-3428.
252. Shi, A. P., Tang, X. Y., Xiong, Y. L., Zheng, K. F., Liu, Y. J., Shi, X. G., . . . Zhao, J. B. (2021). Immune Checkpoint LAG3 and Its Ligand FGL1 in Cancer. *Front Immunol*, 12, 785091. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.785091>
253. Shi, Q., Abbruzzese, J. L., Huang, S., Fidler, I. J., Xiong, Q., & Xie, K. (1999). Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res*, 5(11), 3711-3721.
254. Society, G. N. (2012). New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab*, 60(4), 241-246. <https://doi.org/10.1159/000337547>
255. Solomon, B., Young, R. J., Bressel, M., Urban, D., Hendry, S., Thai, A., . . . Rischin, D. (2018). Prognostic Significance of PD-L1. *Cancer Immunol Res*, 6(3), 295-304. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0299>
256. Soysal, S. D., Tzankov, A., & Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3-4), 142-152. <https://doi.org/10.1159/000430499>
257. Spalding, T. J., Dewar, E. P., Buchanan, J. D., Mugridge, A. R., & Conroy, B. (1989). Fine needle aspiration cytology as part of a three stage diagnostic approach to breast lumps in a District general hospital. *J R Nav Med Serv*, 75(1), 5-9.
258. Spector, M. E., Bellile, E., Amlani, L., Zarins, K., Smith, J., Brenner, J. C., . . . Program, U. o. M. H. a. N. S. (2019). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 145(11), 1012-1019. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.2427>
259. St John, M. A., Li, Y., Zhou, X., Denny, P., Ho, C. M., Montemagno, C., . . . Wong, D. T. (2004). Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 130(8), 929-935. <https://doi.org/10.1001/archotol.130.8.929>

260. Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympson, C. J., Huey, B., Rougier, J. P., Gray, J. W., . . . Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, *98*(2), 137-146. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81009-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81009-0)
261. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., . . . Keyes, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, *155*(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
262. Strome, S. E., Dong, H., Tamura, H., Voss, S. G., Flies, D. B., Tamada, K., . . . Chen, L. (2003). B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, *63*(19), 6501-6505.
263. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
264. Tadbir, A. A., Purshahidi, S., Ebrahimi, H., Khademi, B., Malekzadeh, M., Mardani, M., . . . Sardari, Y. (2012). Serum level of MMP-3 in patients with oral squamous cell carcinoma--lack of association with clinico-pathological features. *Asian Pac J Cancer Prev*, *13*(9), 4545-4548. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.9.4545>
265. Takiishi, T., Van Belle, T., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2013). Effects of vitamin D on antigen-specific and non-antigen-specific immune modulation: relevance for type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*, *14*(2), 81-89. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2012.00923.x>
266. Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., . . . Franceschi, S. (2002). Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*, *13*(10), 957-964. <https://doi.org/10.1023/a:1021944123914>
267. Tangthongkum, M., Kirtsreesakul, V., Supanimitjaroenporn, P., & Leelasawatsuk, P. (2017). Treatment outcome of advance staged oral cavity cancer: concurrent chemoradiotherapy compared with primary surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, *274*(6), 2567-2572. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4540-9>
268. Triebel, F., Jitsukawa, S., Baixeras, E., Roman-Roman, S., Genevee, C., Viegas-Pequignot, E., & Hercend, T. (1990). LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, *171*(5), 1393-1405. <https://doi.org/10.1084/jem.171.5.1393>
269. Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., . . . Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*, *193*(7), 839-846. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.839>

270. Tsiaras, W. G., & Weinstock, M. A. (2011). Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*, *91*(2), 115-124. <https://doi.org/10.2340/00015555-0980>
271. van Halteren, A. G., Tysma, O. M., van Etten, E., Mathieu, C., & Roep, B. O. (2004). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. *J Autoimmun*, *23*(3), 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.06.004>
272. Vanherwegen, A. S., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2017). Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism. *Mol Cell Endocrinol*, *453*, 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.018>
273. Veldman, C. M., Cantorna, M. T., & DeLuca, H. F. (2000). Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*, *374*(2), 334-338. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1605>
274. Vihinen, P., & Kähäri, V. M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*, *99*(2), 157-166. <https://doi.org/10.1002/ijc.10329>
275. Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., & Hong, W. K. (1993). Head and neck cancer. *N Engl J Med*, *328*(3), 184-194. <https://doi.org/10.1056/NEJM199301213280306>
276. Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T., & Honjo, T. (2005). Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(33), 11823-11828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505497102>
277. Wang, M., Qin, X., Mudgett, J. S., Ferguson, T. A., Senior, R. M., & Welgus, H. G. (1999). Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(12), 6885-6889. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6885>
278. Wang, Y., Dong, T., Xuan, Q., Zhao, H., Qin, L., & Zhang, Q. (2018). Lymphocyte-Activation Gene-3 Expression and Prognostic Value in Neoadjuvant-Treated Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*, *21*(2), 124-133. <https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.2.124>
279. Waugh, D. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, *14*(21), 6735-6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
280. Weinstein, G. S., O'Malley, B. W., Magnuson, J. S., Carroll, W. R., Olsen, K. D., Daio, L., . . . Holsinger, F. C. (2012). Transoral robotic surgery: a multicenter study to assess feasibility, safety, and surgical margins. *Laryngoscope*, *122*(8), 1701-1707. <https://doi.org/10.1002/lary.23294>

281. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., & Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, *77*(8), 4911-4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003>
282. Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, *15*(8), 486-499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
283. Wiener, Z., Kohalmi, B., Pocza, P., Jeager, J., Tolgyesi, G., Toth, S., . . . Falus, A. (2007). TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol*, *127*(4), 906-914. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700616>
284. Windon, M. J., D'Souza, G., Rettig, E. M., Westra, W. H., van Zante, A., Wang, S. J., . . . Fakhry, C. (2018). Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*, *124*(14), 2993-2999. <https://doi.org/10.1002/cncr.31385>
285. Wittekindt, C., Wagner, S., Bushnak, A., Prigge, E. S., von Knebel Doeberitz, M., Würdemann, N., . . . Klussmann, J. P. (2019). Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prev Res (Phila)*, *12*(6), 375-382. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098>
286. Wolf, G. T., Chepeha, D. B., Bellile, E., Nguyen, A., Thomas, D., McHugh, J., & Program, U. o. M. H. a. N. S. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. *Oral Oncol*, *51*(1), 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.006>
287. Wolf, Y., Anderson, A. C., & Kuchroo, V. K. (2020). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol*, *20*(3), 173-185. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>
288. Wong, I. C., Ng, Y. K., & Lui, V. W. (2014). Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air pollution. *Chin J Cancer*, *33*(10), 476-480. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10093>
289. Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, *80*(8 Suppl), 1529-1537. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19971015\)80:8+<1529::aid-cncr2>3.3.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+<1529::aid-cncr2>3.3.co;2-#)
290. Workman, C. J., Dugger, K. J., & Vignali, D. A. (2002). Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol*, *169*(10), 5392-5395. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5392>

291. Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2003). The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *Eur J Immunol*, 33(4), 970-979. <https://doi.org/10.1002/eji.200323382>
292. Workman, C. J., Wang, Y., El Kasmi, K. C., Pardoll, D. M., Murray, P. J., Drake, C. G., & Vignali, D. A. (2009). LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*, 182(4), 1885-1891. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800185>
293. Xu, H., Soruri, A., Gieseler, R. K., & Peters, J. H. (1993). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand J Immunol*, 38(6), 535-540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1993.tb03237.x>
294. Xu, J., Shen, D., Zhang, T., Wang, J., De, W., & Zhang, J. (2021). Lymphocyte-activated gene-3 (LAG3) protein expressed in tumor-infiltrating lymphocytes of colorectal cancer. *Pol J Pathol*, 72(4), 324-330. <https://doi.org/10.5114/pjp.2021.114177>
295. Xu, K., Fu, Y., Han, Y., Xia, R., Xu, S., Duan, S., . . . Li, J. (2020). Fewer tumour-specific PD-1. *Br J Cancer*, 123(6), 932-941. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0966-8>
296. Yan, J., Zhang, Y., Zhang, J. P., Liang, J., Li, L., & Zheng, L. (2013). Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. *PLoS One*, 8(3), e58006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058006>
297. Yang, F., Zeng, Z., Li, J., Ren, X., & Wei, F. (2021). TIM-3 and CEACAM1 are Prognostic Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Mol Biosci*, 8, 619765. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.619765>
298. Yang, H., Liang, J., Zhou, J., Mi, J., Ma, K., Fan, Y., . . . Li, E. (2016). Knockdown of RHOC by shRNA suppresses invasion and migration of cholangiocellular carcinoma cells via inhibition of MMP2, MMP3, MMP9 and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep*, 13(6), 5255-5261. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5170>
299. Yang, S. W., Tsai, C. Y., Pan, Y. C., Yeh, C. N., Pang, J. H., Takano, M., . . . Chiang, K. C. (2016). MART-10, a newly synthesized vitamin D analog, represses metastatic potential of head and neck squamous carcinoma cells. *Drug Des Devel Ther*, 10, 1995-2002. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S107256>
300. Yao, C., Lin, Y., Chua, M. S., Ye, C. S., Bi, J., Li, W., . . . Wang, S. M. (2007). Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int J Cancer*, 121(9), 1949-1957. <https://doi.org/10.1002/ijc.22930>
301. Yao, C., Lin, Y., Ye, C. S., Bi, J., Zhu, Y. F., & Wang, S. M. (2007). Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Chin Med J (Engl)*, 120(20), 1766-1772.

302. Ye, H., Yu, T., Temam, S., Ziober, B. L., Wang, J., Schwartz, J. L., . . . Zhou, X. (2008). Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*, *9*, 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-69>
303. Yoshizaki, T., Maruyama, Y., Sato, H., & Furukawa, M. (2001). Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, *95*(1), 44-50. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010120\)95:1<44::aid-ijc1008>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010120)95:1<44::aid-ijc1008>3.0.co;2-m)
304. Yuan, A., Chen, J. J., Yao, P. L., & Yang, P. C. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*, *10*, 853-865. <https://doi.org/10.2741/1579>
305. Yuan, L., Zhai, L., Qian, L., Huang, Ding, Y., Xiang, H., . . . Wang, X. F. (2018). Switching off IMMP2L signaling drives senescence via simultaneous metabolic alteration and blockage of cell death. *Cell Res*, *28*(6), 625-643. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0043-5>
306. Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., & Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*, *188*(12), 2205-2213. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2205>
307. Zamani, M., Grønhoj, C., Jensen, D. H., Carlander, A. F., Agander, T., Kiss, K., . . . von Buchwald, C. (2020). The current epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer: An 18-year Danish population-based study with 2,169 patients. *Eur J Cancer*, *134*, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.04.027>
308. Zandberg, D. P., Algazi, A. P., Jimeno, A., Good, J. S., Fayette, J., Bouganim, N., . . . Mesía, R. (2019). Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from a single-arm, phase II study in patients with $\geq 25\%$ tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*, *107*, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.015>
309. Zandberg, D. P., & Strome, S. E. (2014). The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*, *50*(7), 627-632. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.04.003>
310. Zhang, S., Wang, D., & Yan, Z. (2021). Increasing of matrix metalloproteinase 3 in bovine endometritis. *Theriogenology*, *175*, 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.001>
311. Zhang, Y., Cai, P., Li, L., Shi, L., Chang, P., Liang, T., . . . Hu, L. (2017). Co-expression of TIM-3 and CEACAM1 promotes T cell exhaustion in colorectal cancer

- patients. *Int Immunopharmacol*, 43, 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.024>
312. Zhang, Y., Li, L., Zheng, W., Zhang, L., & Yao, N. (2022). CD8. *Ann Transl Med*, 10(6), 273. <https://doi.org/10.21037/atm-22-867>
313. Zhao, B., Liu, P., Fukumoto, T., Nacarelli, T., Fatkhutdinov, N., Wu, S., . . . Zhang, R. (2020). Topoisomerase 1 cleavage complex enables pattern recognition and inflammation during senescence. *Nat Commun*, 11(1), 908. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14652-y>
314. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., . . . Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 6(12), 1245-1252. <https://doi.org/10.1038/ni1271>
315. Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Chocarro, L., Vera, R., Escors, D., . . . Kochan, G. (2020). Systemic CD4 immunity: A powerful clinical biomarker for PD-L1/PD-1 immunotherapy. *EMBO Mol Med*, 12(9), e12706. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012706>
316. Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Fernandez, G., Chocarro, L., Vera, R., . . . Escors, D. (2020). Systemic CD4 Immunity as a Key Contributor to PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy Efficacy. *Front Immunol*, 11, 586907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586907>
317. Zuazo, M., Arasanz, H., Fernández-Hinojal, G., García-Granda, M. J., Gato, M., Bocanegra, A., . . . Escors, D. (2019). Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. *EMBO Mol Med*, 11(7), e10293. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910293>

11. Publikationen

Poster:

Meike Vorschel, Jan-Philipp Kühn, Florian Bochen, Sandrina Körner, Silke Wemmert, Mathias Wagner, Bernhard Schick, Maximilian Linxweiler. **T-cell exhaustion and stroma senescence – the impact of tumor microenvironment on tumor cell biology and prognosis of head and neck carcinomas.**

Ausgestellt auf der 93. DGHNO-Jahrestagung 2022 in Hannover

Die Veröffentlichung der Ergebnisse als Originalarbeit befindet sich in Vorbereitung, eine Einreichung bei dem Journal *Cancer Immunology, Immunotherapy* ist für das Frühjahr 2023 geplant.

12. Danksagung

Schlussendlich möchte ich einen herzlichen Dank an viele Personen aussprechen, die mich im Rahmen dieser Arbeit zuverlässig und mit enormer Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler für das Überlassen des spannenden Themas, sowie die intensive Unterstützung mit einer stets schnellen, zuverlässigen und entgegenkommenden Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken. Sein persönliches Engagement und die überragende Betreuung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Möglichkeit danken, dass ich meine Arbeit an seiner Klinik schreiben durfte und darüber hinaus freundlich aufgenommen und hervorragend betreut wurde.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeiter*Innen des Forschungslabors, insbesondere Frau Ulrike Bechtel, Frau Carolin Bick, Frau Sandrina Körner, Dr. rer. nat. Silke Wemmert und Dr. rer. nat. Florian Bochen. Für die überaus freundliche Aufnahme, das geduldige Heranführen an die Methodik der Immunhistochemie, die große Hilfsbereitschaft in sämtlichen Fragestellungen und das stets angenehme Arbeitsklima bin ich sehr dankbar.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Bohle, Herrn PD Dr. Mathias Wagner und Frau Prof. Dr. med. Sigrun Smola für die wertvolle Kooperation und gelungene Zusammenarbeit. Die Bereitstellung der FFPE-Gewebeschnitte sowie der klinisch-pathologischen Patientendaten erwiesen sich als elementare Bausteine zum Fertigstellen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere aber meinen Eltern für die fantastische Unterstützung danken, die mir glücklicherweise zu jedem Zeitpunkt bedingungslos geschenkt wird.

13. Lebenslauf

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

Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion: 06.06.2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Maximilian Linxweiler

Prof. Dr. Markus Hoth

Prof. Dr. Markus Hecht