

Regulation von PD-L1  
und dessen zellintrinsische Funktion  
für die Vermittlung von Radioresistenz  
im Kopf-Hals-Tumor



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften  
(Dr. rer. physiol.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Daniela Schulz  
aus  
Augsburg

im Jahr  
2020



Regulation von PD-L1  
und dessen zellintrinsische Funktion  
für die Vermittlung von Radioresistenz  
im Kopf-Hals-Tumor



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften  
(Dr. rer. physiol.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Daniela Schulz  
aus  
Augsburg

im Jahr  
2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl

1. Mentor: PD Dr. Richard Bauer

2. Mentor: Prof. Dr. Gero Brockhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Oktober 2020



## Literaturverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Inzidenz und Ätiologie von HNSCCs .....	8
1.2	Karzinogenese .....	10
1.2.1	Mutationen und Reparaturmechanismen .....	10
1.2.2	Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	13
1.2.3	Symptome und Diagnose von HNSCCs.....	14
1.2.4	Zusammensetzung des Tumorgewebes .....	16
1.2.5	Charakteristische Merkmale von Tumorzellen (hallmarks of cancer) .....	18
1.3	Antitumorale Immunantwort .....	19
1.3.1	Immuncheckpoints .....	22
1.3.2	PD-1 und PD-L1 .....	23
1.3.3	Tumor <i>immune escape</i> .....	25
1.4	Therapie .....	26
1.4.1	Standardtherapie von HNSCCs.....	27
1.4.2	Verträglichkeit unterschiedlicher Therapieformen .....	33
1.4.3	Immuntherapie als Hoffnungsträger.....	34
1.4.4	Mögliche Kombinationstherapien .....	36
1.5	Ziel der Arbeit .....	37
2	Material und Methoden .....	38
2.1	Material.....	38
2.1.1	Zelllinien.....	38
2.1.2	Reagenzien und Lösungen .....	39
2.1.3	Kits und Arrays .....	41
2.1.4	Antikörper.....	41
2.1.5	siRNA und Plasmide .....	42
2.1.6	Primer und Sonden .....	42
2.1.7	Verbrauchsmaterial .....	42
2.1.9	Geräte .....	44
2.1.10	Software.....	45
2.2	Methoden .....	46
2.2.1	Zellkultur .....	46
2.2.2	Behandlung .....	49

2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	55
2.2.4	Funktionelle Assays .....	82
2.2.5	Statistische Auswertung .....	89
3	Ergebnisse .....	90
3.1	Etablierung eines geeigneten Modells zur Untersuchung von Radioresistenz .....	90
3.1.1	Verwendete HNSCC-Zelllinien .....	90
3.1.2	Konfluenz nach Radiatio .....	92
3.1.3	Vitalität nach Radiatio .....	93
3.1.4	Verdopplungszeit nach Radiatio .....	94
3.1.5	Apoptoserate nach Radiatio .....	95
3.2	PD-L1-Basalexpression von HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität .....	97
3.2.1	PD-L1-Genexpression .....	97
3.2.2	PD-L1-Proteinexpression .....	98
3.2.3	PD-L1-Membranexpression.....	99
3.3	Einfluss der Radiatio auf HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität ..	100
3.3.1	FACS-Apoptose-Assay nach Radiatio .....	100
3.3.2	PD-L1-Expression in RR HNSCC-Zelllinien nach Radiatio.....	102
3.3.3	Zelluläre Lokalisation von PD-L1 nach Radiatio .....	104
3.4	Zellintrinsische Funktionen von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien .....	112
3.4.1	Einfluss von PD-L1 auf das Überleben der RS Zelllinien nach Radiatio .....	114
3.4.2	Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien .....	116
3.4.3	Einfluss von PD-L1 auf Migration und Invasion.....	117
3.5	Regulation von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien.....	119
3.5.1	Stabilisierung von PD-L1 nach Radiatio durch Inhibition von GSK-3 $\beta$ .....	119
3.5.2	Einfluss des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die PD-L1-Expression.....	122
3.5.3	Einfluss von PD-L1 auf die Ausrichtung des Zytoskeletts.....	130
4	Diskussion.....	134
4.1	Etablierung des Modells zur Untersuchung von Radioresistenz im HNSCC.....	134
4.1.1	Auswahl geeigneter Zelllinien .....	134
4.1.2	Bestrahlungsdosis.....	135
4.1.3	Konfluenzbedingter Selektionsdruck .....	136
4.1.4	Angewandte Methoden.....	137

4.2	PD-L1 als klinischer Biomarker.....	138
4.2.1	Bestimmung des PD-L1-Status.....	138
4.2.2	Zellintrinsische Funktionen von PD-L1.....	140
4.3	PD-L1-Expression von HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität .....	145
4.3.1	Basalexpression von PD-L1.....	145
4.3.2	PD-L1-Expression nach Radiatio.....	146
4.3.3	Synergie zwischen Strahlentherapie und Immuncheckpoint-Blockade .....	147
4.4	Stabilisierung von PD-L1 .....	148
4.4.1	Glykosylierung von PD-L1.....	148
4.4.2	GSK-3 $\beta$ -Aktivität.....	148
4.4.3	PD-L1-Stabilisierung in RR Zelllinien durch Inaktivierung von GSK-3 $\beta$ .....	149
4.4.4	PD-L1-Stabilisierung in RS Zelllinien durch Inaktivierung von GSK-3 $\beta$ .....	150
4.4.5	Alternative Mechanismen zu Stabilisierung von PD-L1 .....	150
4.5	Die zelluläre Lokalisation von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien.....	153
4.5.1	PD-L1-Membranexpression.....	153
4.5.2	PD-L1-Expression in Nukleus und Zytoplasma .....	156
4.5.3	Nähere Charakterisierung vitaler und apoptotischer Subpopulationen.....	160
4.5.4	Einfluss der PD-L1-Lokalisation auf das Überleben nach Radiatio .....	161
4.6	Zellintrinsische Funktion von PD-L1 .....	163
4.6.1	Einfluss von PD-L1 auf das Überleben der RS Zelllinien nach Radiatio .....	163
4.6.2	Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien .....	164
4.6.3	Einfluss von PD-L1 auf Migration und Invasion.....	168
5	Zusammenfassung .....	172
6	Anhang.....	174
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	174
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	181
6.3	Tabellenverzeichnis.....	184
6.4	Literaturverzeichnis.....	186

## 1 Einleitung

Immer mehr Menschen weltweit entwickeln Malignome im Kopf-Halsbereich. Histologisch handelt es sich dabei zumeist um Plattenepithelkarzinome (engl.: *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) (1). Das 5-Jahres-Überleben Betroffener liegt seit Jahrzehnten, trotz medizinischer Fortschritte, bei lediglich 60 % (2). Therapeutisch gilt in den Anfangsstadien die chirurgische Resektion des Primärtumors nach wie vor als Goldstandard. Fortgeschrittene, operable Tumoren werden zumeist multimodal mittels Resektion und Radio- bzw. Radiochemotherapie behandelt. Inoperable und metastasierte Tumoren werden primär bestrahlt und/oder chemotherapiert, wobei bei letzteren die Antikörper- und Immuntherapie zunehmend an Bedeutung gewinnt. Bis heute ist nicht geklärt, weshalb Radio- oder Chemotherapie bei einigen Patienten zu einer Remission des Tumors führen, während bei anderen Patienten ein Ansprechen des Karzinoms auf die Therapie ausbleibt. Daher besteht dringender Bedarf, die Ursachen der Resistenzmechanismen beim HNSCC zu erforschen.

In den letzten Jahren weckte vor allem die Immuntherapie Hoffnungen. Immuntherapien sind darauf ausgerichtet, die Eliminierung von Tumorzellen durch das eigene Immunsystem zu ermöglichen. Immuncheckpoint-Inhibitoren sind eine äußerst wirksame Klasse von Immuntherapien. Seit 2011 wurden insgesamt sieben verschiedene Immuncheckpoint-Inhibitoren durch die FDA zugelassen (3). Zwei Immuntherapeutika, Nivolumab und Pembrolizumab, sind seit 2016 auch zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem oder metastasierendem (R/M) HNSCC genehmigt. Hierbei handelt es sich um monoklonale anti-PD-1 Antikörper (4). Das Immuncheckpoint-Molekül PD-1 fungiert als inhibitorischer Rezeptor der T-Zell-Aktivierung. Die Interaktion mit seinem Liganden PD-L1 supprimiert die T-Zell-vermittelte Immunantwort und verhindert so die Eliminierung des Tumors (5). Antikörper, die die PD-1/PD-L1-Achse inhibieren, können diese suppressive Signalübertragung blockieren und so den Angriff des Immunsystems zulassen.

Vor allem beim metastasierenden Melanom, aber auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) hat eine Blockade dieser inhibitorischen Checkpoints beeindruckende Remissionsraten erzielt (6–8). Eine aktuelle Studie an HNSCC konnte durch eine Blockade von PD-1 mit dem anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab eine Ansprechrate von insgesamt 20 % zeigen (9). Eine weitere kürzlich erschienene Studie an Patienten mit Platin-refraktärem Rezidiv eines HNSCC zeigte ein signifikant längeres Überleben von Patienten, die mit Nivolumab therapiert wurden (10).

Doch nicht alle Patienten profitieren von dieser Therapieform. Einige zeigten sogar Hyperprogression (11). Aktuelles Ziel der Forschung ist es, solche Therapiemisserfolge zu erklären und neue, erfolgreichere Therapieansätze zur Behandlung von HNSCC zu finden. Dafür müssen die Mechanismen weiter aufgeklärt werden, die Tumorentstehung und Tumorprogression regulieren und Resistenzen vermitteln.

PD-L1, das als immunregulatorisches Protein bekannt geworden ist, übernimmt eine zentrale Rolle bei der Fehlregulation von antitumoralen Immunantworten. Daher ist es ein beliebter Angriffspunkt für neu entwickelte Immuntherapien. Tatsächlich gibt es immer mehr Hinweise, dass PD-L1 neben seiner immunregulatorischen Funktion auch zellintrinsische Funktionen in Tumorzellen vermittelt, die eine Tumorprogression begünstigen und die Eliminierung durch verschiedene Therapieformen, einschließlich der Strahlentherapie, erschweren. Doch vor allem beim HNSCC fehlt es an Nachweisen einer solchen intrinsischen Signalwirkung von PD-L1. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Regulation von PD-L1 und dessen zellintrinsische Funktionen im HNSCC weiter aufzuklären.

Im Folgenden wird näher auf die allgemeine Entstehung von Tumoren und speziell auf die Karzinogenese des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms eingegangen. Es wird erläutert, wie im Allgemeinen eine antitumorale Immunantwort generiert wird und welche Mechanismen das Immunsystem an der Eliminierung von Tumorzellen hindern. Auch das Prinzip von Immuntherapien und die zentrale Rolle, die dabei das immunregulatorische Protein PD-L1 einnimmt, wird erklärt. Es wird diskutiert, welchen Vorteil Kombinationstherapien bieten können und weshalb PD-L1 als Biomarker umstritten ist, obwohl es ein vielversprechendes Zielprotein bei der Immuntherapie ist.

## 1.1 Inzidenz und Ätiologie von HNSCCs

Mit über 800.000 Menschen, die jährlich an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich erkranken, stellt das HNSCC mittlerweile die achthäufigste Tumorart weltweit dar (1). Laut einer Statistik des Robert Koch Instituts wurden 2016 in Deutschland knapp 14.000 neue Fälle diagnostiziert (12). Männer erkranken etwa zwei bis dreimal häufiger als Frauen (13). Histologisch ist das Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma, SCC) mit einem Anteil von etwa 90 % die häufigste Tumorart unter den Malignomen im Kopf-Halsbereich. Es findet sich vorwiegend im Bereich der Mundhöhle, des Oropharynx, Pharynx und Larynx. Zu den drei bedeutendsten Risikofaktoren zählen Tabak- und Alkoholkonsum sowie HPV-Infektionen (14).

Rauchen und ein übermäßiger Alkoholkonsum können das Risiko HNSCCs zu entwickeln etwa um den Faktor 10 steigern, in Abhängigkeit von der Dauer und der Häufigkeit der Exposition (15,16). Selbst Passivraucher entwickeln häufiger HNSCCs als Nichtraucher (17). 90 % der Neudiagnosen sind auf intensiven Konsum von Alkohol und Tabak zurückzuführen (18), wobei beide Faktoren einen synergistischen Effekt haben (18). Auch eine Infektion mit onkogenen Viren kann die Entwicklung von Tumoren im Kopf-Halsbereich begünstigen (19). Von Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) sind vor allem Gebiete wie Nordamerika, Nordeuropa und Südostasien betroffen. Die DNA onkogener Viren wird dort in etwa 25 % aller HNSCCs nachgewiesen. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um Oropharynxkarzinome. Von den mehr als 120 bekannten HPV-Typen sind in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs am häufigsten die Typen HPV-16 und HPV-18 nachweisbar (20). Diese sind auch als häufigste Typen in Zervixkarzinomen vertreten (21).

Ein weiterer Faktor, der das Auftreten von HNSCCs begünstigt, sind die Inhaltsstoffe der in Südasien beliebten Betelnuss (22). Auch Immunsuppression nach einer Organtransplantation (23) oder infolge einer HIV-Infektion wird mit einem häufigeren Auftreten von Karzinomen im Bereich der Lippe, Mundhöhle und des Pharynx in Verbindung gebracht (24,25). Ebenso werden genetische Erkrankungen wie die Fanconi-Anämie (26), Dyskeratosis congenita und das Bloom-Syndrom (14) mit der Entwicklung von HNSCCs assoziiert. Auch die Exposition gegenüber ultravioletter Strahlung (vor allem UVB) (12), Schwermetallen (27) oder hohen Konzentrationen von Lösungsmitteln, sowie Metall-, Holz- und Zementstäuben (28) stehen in Verdacht für das Auftreten von HNSCCs.

Eine wachsende Anzahl von Forschungsarbeiten beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen dem oralen Mikrobiom und der Entstehung von Tumoren in diesem Bereich. Denn das orale Mikrobiom unterscheidet sich durchaus zwischen gesunden Personen und Patienten mit HNSCC. Ob das veränderte Mikrobiom die Entstehung von HNSCCs begünstigt oder ob sich das Mikrobiom infolge der Mundschleimhautveränderung anpasst, ist noch unklar. Mögliche Mechanismen, die hier zur Onkogenese beitragen können, wären 1) die Entwicklung von Pro-Karzinogenen, bedingt durch die Umwandlung von Ethanol in Acetaldehyd durch *Candida*, *Neisseria* und Streptokokken, 2) die Entwicklung von Karzinogenen, bedingt durch die Produktion von Nitrosaminen durch *Candida*, 3) eine chronische Inflammation durch beispielsweise Parodontose-fördernde Bakterien, die mit einer Produktion von Zytokinen einhergehen, die Proliferation induzierenden und Apoptose hemmen, 4) der direkte Einfluss von Bakterien auf den Zellzyklus, 5) oder die direkte Schädigung von DNA durch bakterielle Toxine (29–31).

Auch wenn die Zusammensetzung des Mikrobioms im Moment nicht nachweislich in Zusammenhang mit der Entstehung von HNSCC gebracht werden kann, scheint eine schlechte Mundhygiene HNSCCs dennoch zu begünstigen (31).

Das mittlere Erkrankungsalter von Männern liegt aktuell bei 63, für Frauen bei 66 Jahren (13). Das hohe Durchschnittsalter dieser Erkrankung könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Dauer der Exposition gegenüber toxischen Substanzen mit der Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung korreliert.

Um zu verstehen, wie diese Risikofaktoren zur Entstehung von HSCCs beitragen können, wird im Folgenden näher auf die Karzinogenese im Allgemeinen eingegangen.

## 1.2 Karzinogenese

Der menschliche Körper besteht neuesten Schätzungen zufolge aus etwa  $3,72 \times 10^{13}$ , also mehr als 37.000 Milliarden eukaryotischen Zellen (32). Beeindruckend ist, dass diese Vielzahl an Zellen mit ihrer Diversität und ihren unterschiedlichen Funktionen ihren Ursprung tatsächlich in einer einzigen totipotenten Stammzelle finden, nämlich der befruchteten Eizelle. Auf jede dieser Zellen soll bei der Zellteilung eine identische Kopie des Erbguts übertragen werden. Um dies zu gewährleisten, sind die Mechanismen der Zellteilung streng reguliert. Trotzdem entstehen pro Tag im Durchschnitt vermutlich etwa 60.000 neue DNA-Mutationen (33). Die Mutationsrate wird von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst. Durch sogenannte *DNA damage response pathways* werden Reparaturmechanismen aktiviert, die DNA-Schäden während des Zellzyklus minimieren. Sind diese Mechanismen gestört, kann eine hohe Mutationsrate und vor allem die Mutation in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen die Entstehung und Progression von Tumorzellen fördern (34).

### 1.2.1 Mutationen und Reparaturmechanismen

Bereits bei der DNA Replikation, bei der pro Zellteilung etwa  $3 \times 10^9$  Basenpaare von insgesamt 23 Chromosomen dupliziert werden, können Fehler unterlaufen (35). Die DNA-Polymerase kann 50 Basenpaaren pro Sekunde anfügen und arbeitet trotzdem mit hoher Genauigkeit. Durch sogenanntes *proofreading* kann der Einbau falscher Basen in der zu replizierenden DNA noch während der Replikation behoben werden. Trotzdem bleibt geschätzt ein falsches Basenpaar alle  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{10}$  Basen während der Replikation unbemerkt (36). Enzyme können diese Fehler erkennen und durch einen Mechanismus, genannt *mismatch repair* (MMR), falsch platzierte Basen durch Richtige ersetzen (37). Auch toxische Stoffwechselprodukte die natürlicherweise in der Zelle entstehen können die Rate solcher endogenen Mutationen erhöhen (38).

Liegen Punktmutationen außerhalb des Bereichs codierender Gene, handelt es sich um eine stille Mutation, die ohne Folgen bleibt. Treten Mutationen in niedriger Frequenz auf, kann der Organismus möglicherweise sogar von dieser sich daraus entwickelten genetischen Variation profitieren. Doch Krankheitsbilder wie die Sichelzellanämie zeigen, wie selbst eine einzige Punktmutation schwerwiegende Folgen für den Organismus haben kann. Hier liegt die Punktmutation innerhalb eines Gens das für eine der Untereinheiten des Hämoglobins codiert. Diese Punktmutation führt zur Translation der Aminosäure Valin anstelle von Glutaminsäure. Solch eine Mutation wird als *missense mutation* bezeichnet (39,40).



Punktmutationen können auch die katalytische Einheit von Enzymen funktionsunfähig machen oder durch ein frühzeitiges Erscheinen eines Stop-Codons, die sog. *nonsense mutation* die Proteinsynthese gänzlich abbrechen (41). Vor allem der zusätzliche Einbau oder der Verlust einer Base im DNA Strang kann großen Einfluss haben. Diese sogenannte *frameshift mutation*, verschiebt den Leserahmen für Codons und beeinträchtigt die Funktionalität einer ganzen Reihe von Proteinen. Oft führt diese Verschiebung zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese (42).

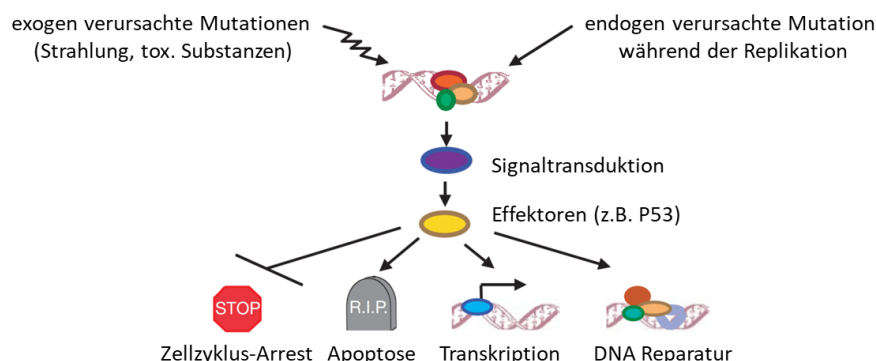
Auch exogene Faktoren können die Mutationsrate erhöhen. Darunter zählen beispielsweise die Exposition gegenüber toxischen Substanzen oder ionisierender Strahlung. Diese können ebenfalls Punktmutationen, Insertionen und Deletionen von Basen im DNA-Strang sowie DNA-Strangbrüche hervorrufen. Hoch energetische Strahlung wie UV-Licht, Röntgen- und Gamma-Strahlen führen zur Bildung von Thymin-Dimeren. UVA und UVB Strahlung starker Sonneneinstrahlung kann in einer einzelnen Zelle bis zu 100.000 Läsionen pro Stunde hervorrufen (43). Durch den sogenannten *nucleotide excision repair* (NER) können defekte Basen entfernt und ersetzt werden (44). Chemische Mutagene, die in der Lage sind, Basen zu oxidieren, wandeln Guanin in 8-oxo-Guanin um. Diese modifizierte Base bildet anstelle von Cytosin ein Basenpaar mit Adenin und kann so unter Umständen die Funktionalität von Proteinen beeinträchtigen (45). Alkalisierende Substanzen, darunter auch Tabakrauch und Alkohol, können Methylgruppen an DNA anfügen, welche die Replikation und Transkription behindern (46). DNA-Glykosylasen erneuern diese modifizierten Basen durch einen Reparaturmechanismus, der sich *base excision repair* (BER) nennt (47). Auch inter- und intrachromosomale Verbindungen (*crosslinks*) zwischen DNA-Strängen können durch alkalisierende Substanzen verursacht werden (48). Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche (SSB, DSB) können neben hochenergetischer Strahlung auch durch oxidativen Stress entstehen. DSBs haben den größten Einfluss auf die genomische Instabilität. Da hier für die Reparatur oft keine Vorlage in Form eines intakten komplementären DNA-Stangs eines Schwesterchromatiden vorliegt, ist eine Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Sequenz nur schwer möglich ist. Dennoch existieren auch für die Reparatur von DSBs Mechanismen, die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Rekombination der DNA-Stränge (NHEJ) (49).

**Abbildung 1** zeigt in einer Übersicht bekannte DNA-Schäden sowie deren Ursache, ebenso die jeweils vorgesehenen Reparaturmechanismen zum Erhalt des genetischen Codes.

<b>Verursacher von DNA-Schädigung</b>	Toxine alkalisierende Substanzen Desaminierung von Basen Fehler bei der Replikation	oxidative Schäden Elektrophilie	ion. Strahlung UV Strahlung Crosslinker Aromat. Verbindungen Hitze Kälte Hypoxie
<b>DNA-Schaden</b>	Basen-Fehlpaarungen Uracil abasische Stellen Addukte	Läsionen Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche	große Läsionen Intra- und Inter-Crosslinks Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche
<b>DNA Reparatur-Mechanismus</b>	Mismatch repair (MMR) Base excision repair (BER)	Base excision repair (BER) Single strand break repair (SSBR) Double strand break repair (DSBR)	Nucleotide excision repair (NER) Intertrans crosslink repair (ICL) Single strand break repair (SSBR) Double strand break repair (DSBR) Transletion synthesis

**Abbildung 1** Mögliche DNA-Schäden und dafür bekannte DNA-Reparaturmechanismen. Modifiziert nach (34).

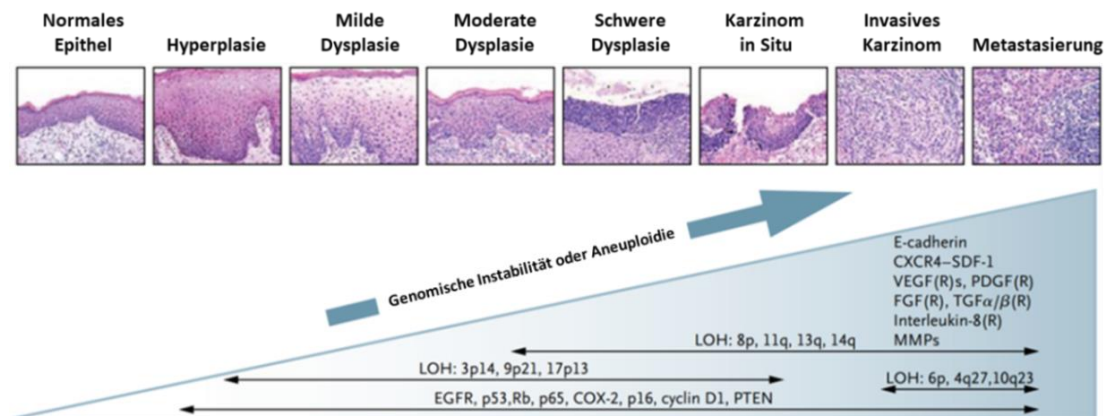
Die möglichen DNA-Schäden sind divers und in einer humanen Zelle befindet sich eine Vielzahl an Enzymen, die an der Reparatur beteiligt sind. Zellzyklus-Checkpoints stellen sicher, dass an verschiedenen Stellen des Zellzyklus pausiert wird, um genügend Zeit für eine DNA-Reparatur schaffen. Dafür wird die sogenannte DNA *damage response* aktiviert, schematisch in **Abbildung 2** dargestellt. Das Protein p53 übernimmt hier eine zentrale Rolle. Als Transkriptionsfaktor steuert es die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion von Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind (50). Sind die vorherrschenden Schäden zu gravierend, wird in diesen Zellen Apoptose induziert, um die Genomstabilität aufrecht zu erhalten. Doch auch dieser Mechanismus kann durch Mutation gestört werden. Betroffene des Louis-BAR-Syndroms beispielsweise tragen eine inaktivierende Mutation im ATM-Gen, das für eine Protein-Kinase codiert, die eine wichtige Funktion bei der Reparatur von DNA-DSB übernimmt. Mit der dadurch verursachten erhöhten Mutationsrate neigen diese Patienten zu einem hohen Krebsrisiko (51).



**Abbildung 2** Nach Induktion von DNA-Schäden durch endogene oder exogene Faktoren werden DNA damage response Signalwege aktiviert. Während eines Zellzyklus-Stopps werden für die DNA-Reparatur relevante Gene transkribiert. Ist die Reparatur unzureichend, wird Apoptose induziert, um die genomische Stabilität aufrecht zu erhalten. Modifiziert nach (52).

### 1.2.2 Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms

Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) entwickelt sich aus entarteten Keratinozyten der Mundschleimhaut (53). Hier handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der in **Abbildung 3** anschaulich dargestellt wird (54). Durch die Akkumulation von genetischen Mutationen entwickeln sich aus einer Hyperplasie des Epithels verschiedene Grade einer Dysplasie, die zur Entstehung eines metastasierenden Karzinoms führen können.

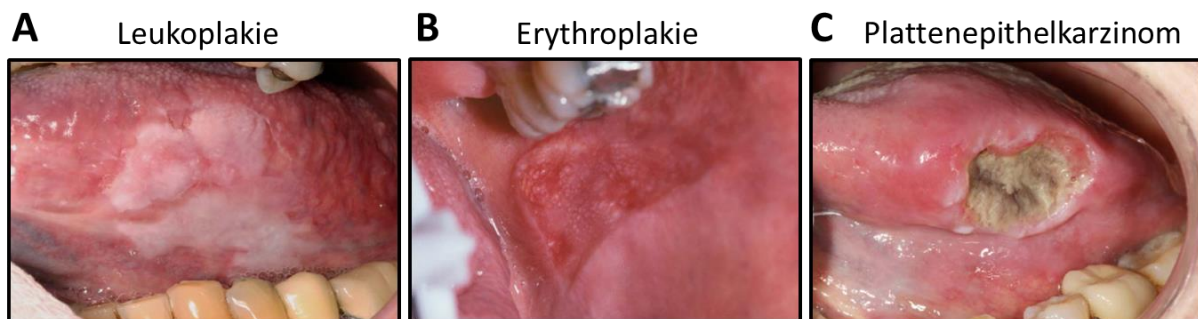


**Abbildung 3** Entwicklungsstufen des oralen Plattenepithelkarzinoms. Modifiziert nach (54).

Genetische Instabilität, einschließlich des Verlusts der Heterozygotie (LOH) bestimmter Chromosomen, und die Fehlregulation von Tumorsuppressorgen und Onkogenen, wie p53, Retinoblastom (Rb), p65, Cyclooxygenase 2 (COX-2), p16, Cyclin D1 und Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN), begünstigen die Onkogenese. Diese bewirken eine veränderte Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie dem vaskulär endothelialen (VEGF)-, dem Thrombozyten (PDGF)-, dem Fibroblasten (FGF)-Wachstumsfaktor und den transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ), sowie Interleukin-8. In 60-80 % der HNSCCs werden somatische Mutationen in den Genen der Tumorsuppressorproteine p53 (55) und p16INK4A (56) nachgewiesen. Diese Gene greifen in die Zellzyklusregulation ein und können zur Immortalisierung der Zelle führen (57). Eine weitere häufige Veränderung im Expressionsmuster ist die Reaktivierung der Telomerase (58), sowie eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR). Dies kann auch auf eine erhöhte Zahl des EGFR-Gens zurückzuführen sein, was mit einer schlechten Prognose korreliert (59). Im Falle einer HPV-Infektion können die viralen Proteine E6 und E7 zur Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und dem Rb-Protein in infizierten Zellen führen und tragen somit entscheidend zur Entartung infizierter Zellen bei (21). Zusammen mit der veränderten Expression von Cadherinen und Matrix-Metalloproteasen (MMP) führen diese Mutationen zu Migration, Invasion und Metastasierung.

### 1.2.3 Symptome und Diagnose von HNSCCs

Wie in **Abbildung 4** aus der Veröffentlichung von Chi und Kollegen beispielhaft dargestellt, können präkanzeröse Veränderungen der Mundschleimhaut in Form von Leukoplakien, Erythroplakien und Leukoerythroplakien auftreten. Diese sind weiße und/oder rote, scharf abgegrenzte Bereiche mit rauer Oberfläche. Mikroskopisch zeigen Leukoplakien eine Hyperkeratose, gegebenenfalls mit Epithelverdickung (Akanthose). Diese Bereiche weisen eine härtere Konsistenz auf als die umgebenden Schleimhautbereiche. Die meisten Erythroplakien sind asymptomatisch, in einigen Fällen wird jedoch berichtet, dass diese Stellen empfindlich sind und brennen (14).



**Abbildung 4** Veränderungen der Mundschleimhaut. A Leukoplakie, als weißer Fleck am seitlichen Zungenrand mit Hyperkeratose und leichter epithelialer Dysplasie. B Erythroplakie, als roter Fleck mit rauer Oberfläche auf der linken hinteren Wangenschleimhaut. C Plattenepithelkarzinom, als tiefe, nekrotische Ulzeration am linken, seitlichen Zungenrand (14).

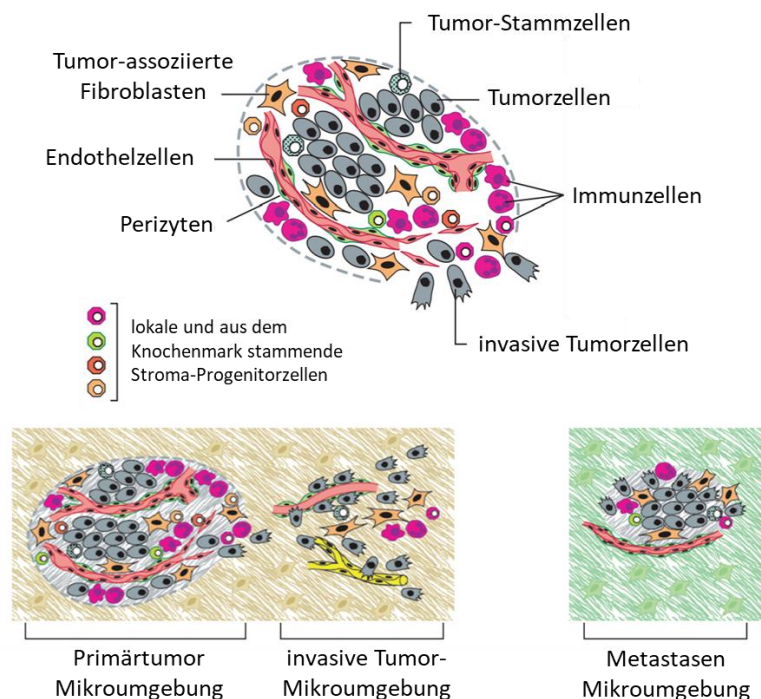
OSCCs können sich in der gesamten Mundhöhle entwickeln. In mehr als 70 % der Fälle sind der Mundboden und die Zunge, vorwiegend am ventralen und lateralen Rand, betroffen (60). Die Wangenschleimhaut, die Gingiva, der weiche Gaumen und das retromolare Dreieck sind seltener betroffen. Am seltensten betroffen sind der Zungengrund und der harte Gaumen (61). Interessanterweise zeigt sich zwischen Männern und Frauen auch ein Unterschied in der Lokalisation dieser Tumoren. So werden bei Männern gehäuft Tumoren des Oropharynx diagnostiziert, während bei Frauen vorwiegend Neubildungen der Mundhöhle und Lippe auftreten. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf den bei Männern höheren Anteil durch Tabak- und Alkoholkonsum begünstigten Tumoren von Mundboden, Zunge und Rachen zurückführen. Diese sind überdies mit geringeren Überlebensaussichten assoziiert, im Gegensatz zu den bei Frauen überwiegend an Lippe und Speicheldrüsen lokalisierten Tumoren (12).

Generell sind Läsionen im Mundbereich, die nach mehr als drei Wochen nicht verheilt sind, potenziell verdächtig und sollten untersucht werden (62). Bei Frauen wird bereits mehr als jeder vierte bis fünfte Tumor im frühen Stadium diagnostiziert, bei Männern nur jeder siebte (12). Diese Beobachtungen könnten erklären, weshalb Frauen im Allgemeinen auch eine bessere Prognose zeigen (63). Obwohl in der Regel präkanzeröse Veränderungen wie Leuko- und Erythroplakien vorausgehen, werden die meisten Tumoren erst in einem späten Stadium entdeckt. Dies liegt darin begründet, dass außer den optischen Veränderungen lange keine Symptome auftreten (64). Im fortgeschrittenen Stadium leiden viele Patienten dann unter starken Schmerzen. Die Ursachen dafür können die dichte Innervation des Mundbereichs durch den Trigeminus-Nerv und vom Tumor sezernierte Mediatoren sein, die zu Schmerzen führen. Auch die Folgen der Behandlung, sowie eine erhöhte Toleranz gegenüber starken Schmerzmitteln wie Opiaten kann zu starken Schmerzen führen (65). Des Weiteren können Ulzera, Schwellungen, Blutungen, Parästhesien, Ohrenscherzen, Atem-, Sprech- und Schluckbeschwerden auftreten. Auch Lockerung oder ein Ausfallen von Zähnen wurden beschrieben. Bei sehr weit fortgeschrittenen Tumoren können auch Hautfisteln, Blutungen, sowie schwere Anämien und Kachexie auftreten (65).

Die erste Diagnose erfolgt häufig beim Zahnarzt durch einen phänotypischen Befund. Diese Diagnose wird durch bildgebende Verfahren und histologische Untersuchungen unterstützt. Eine Biopsie ist für die Diagnose maßgebend (66). Differentialdiagnostisch müssen andere Kopf-Hals-Malignome wie ein Lymphom, Sarkom oder eine Metastase ausgeschlossen werden (64). Um die Ausdehnung des Tumors in der Mundhöhle zu prüfen, werden als bildgebende Verfahren die Magnetresonanztomografie und die Computertomografie eingesetzt (67). Die Stadieneinteilung des Tumors erfolgt nach der sogenannten TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen) für maligne Tumoren durch die UICC, eine internationale Vereinigung zur Prävention, Therapie und Erforschung von Tumoren. So werden neben der Größe des Primärtumors auch die etwaige Beteiligung von regionalen Lymphknoten, sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen miteinbezogen (67). Die Fähigkeit zur Metastasierung steht in direktem Zusammenhang mit dem Grad der Tumordifferenzierung der Krebszellen (53). Auch der HPV-Status wird überprüft (68).

### 1.2.4 Zusammensetzung des Tumorgewebes

Tumorgewebe besteht nicht, wie lange fälschlicherweise angenommen, aus einem homogenen Gewebe maligner Zellen. Tumoren sind je nach Entwicklungsstufe ein äußerst heterogenes, chronisch inflammatorisches Gewebe und vergleichbar mit einer nicht heilenden Wunde. Sie formen ein Gewebe, das neben entarteten Tumorzellen verschiedener Differenzierungsstufen auch Zellen beheimatet, die für die Wundheilung erforderlich sind. So besteht das Tumorgewebe auch aus Stromazellen, die sich aus inflammatorischen Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und mesenchymalen Stammzellen (MSC) zusammensetzen (69,70). Sogenannte Tumorstammzellen sind seltener vorkommende Tumorzellen mit typischen Stammzeleigenschaften, wie Selbsterneuerung und Differenzierungspotenzial. Diese Zellen könnten laut einer erstmals 1997 formulierten Theorie von Bonnet und Dick zur Tumorentstehung (71) und einem Rezidiv nach Behandlung beitragen (72). Auch in HNSCCs sollen Tumorstammzellen verantwortlich für die Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung sein, genauso wie für die Vermittlung von Resistenzen gegenüber verschiedenen Behandlungen, wie der Strahlentherapie (73). Im Tumorstroma versorgen Blutgefäße das Tumorgewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen. **Abbildung 5** zeigt schematisch die im Tumorgewebe befindlichen Zellen.



**Abbildung 5** Zelluläre Zusammensetzung des Tumorgewebes. Modifiziert nach (74).

Von Zellen des Tumorgewebes und der unmittelbaren Umgebung werden bioaktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und verschiedene Typen an Interferonen freigesetzt. So können sich diese Zellen gegenseitig beeinflussen (75). Durch die Sezernierung des *platelet-derived growth factor* (PDGF) durch Tumorzellen wird beispielsweise die Proliferation von Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF) stimuliert. Das von Tumorzellen sezernierte Zytokin *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  aktiviert die TAFs für die Bildung von Bindegewebskomponenten, wie Fibronectin, genauso wie Kollagen Typ I, III und V, die strukturelle Stabilität bieten. Ebenfalls setzen TAFs nach TGF- $\beta$  Stimulation MMPs frei. Bindet schließlich der *hepatocyte growth factor* (HGF) an den an der Tumormembran exprimierten Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met, wird das invasive Wachstum von Tumorzellen gefördert (76).

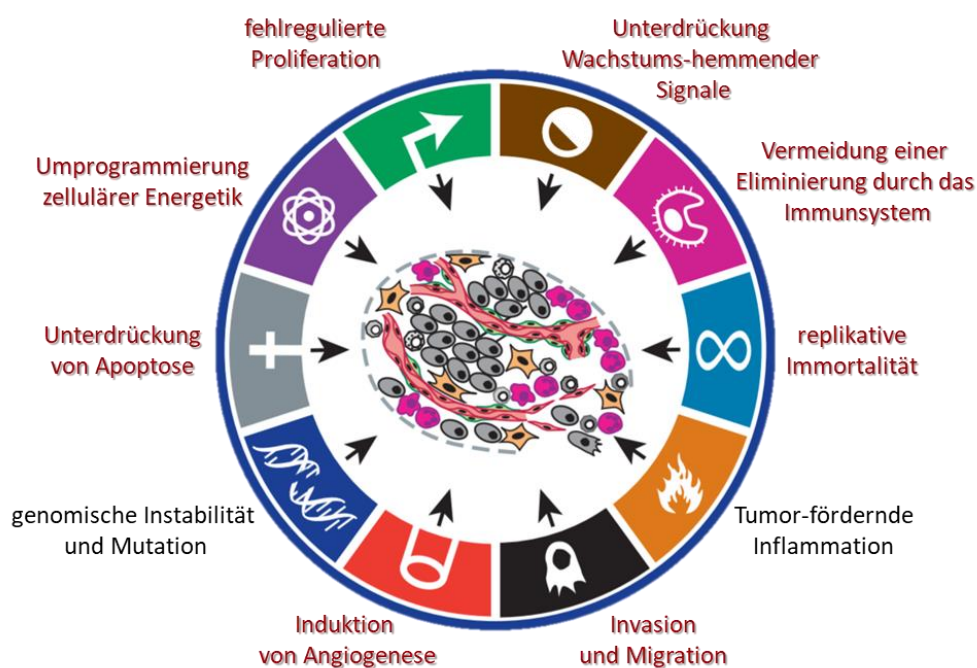
Verlassen Tumorzellen den ursprünglichen Zellverband des Primärtumors und siedeln sich an anderer Stelle an, wird dieser Prozess als Metastasierung bezeichnet. Metastasen können ähnliche Eigenschaften aufweisen wie Zellen des Primärtumors. Häufig befinden sich in Metastasen jedoch Tumorzellen mit anderem Differenzierungsgrad und molekularen Markern. Bekannte epitheliale Marker sind E-Cadherin, Occludine und Zytokeratin. N-Cadherin und Vimentin sind die am häufigsten verwendeten mesenchymalen Marker (77).

Unter den Immunzellen im Tumorgewebe können sich Granulozyten, *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC), Mastzellen, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), B-Lymphozyten und verschiedene Typen an T-Lymphozyten befinden. Obwohl man mit der Präsenz von Immunzellen im Tumorgewebe, vor allem mit T-Lymphozyten, eine Tumoreliminierung und damit eine bessere Prognose assoziieren würde (78), zeigt sich in klinischen Daten für diese Patienten sehr häufig eine schlechtere Prognose (79). Die Infiltration reifer, aktiver DC in Tumoren könnte eine Tumoreliminierung begünstigen. Doch Tumorzellen sind in der Lage, die Funktion DC zu unterdrücken und das Tumormilieu so zu verändern, dass es zu einer Rekrutierung immunsuppressiver DC kommt (80). Experimente im Mausmodell für Brustkrebs konnten zeigen, dass eine Verringerung der Anzahl an Tumor-assoziierten M2 Makrophagen im Tumorgewebe die Tumorprogression verlangsamt und die Metastasierung inhibiert (81). Tumorzellen sind auch in der Lage immunsuppressive regulatorische T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ) zu rekrutieren, die an der Formung des suppressiven Milieus beteiligt sind. Besteht das Verhältnis zwischen immunsuppressiven  $T_{regs}$  und zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen zu Ungunsten der  $CD8^+$ -T-Zellen, geht dies mit einer schlechten Prognose einher (79).



### 1.2.5 Charakteristische Merkmale von Tumorzellen (hallmarks of cancer)

Hanahan und Weinberg formulierten im Jahr 2000 die ersten *hallmarks of cancer*, Merkmale durch die Tumorzellen definiert werden (82). Diese charakteristischen Merkmale, in **Abbildung 6** dargestellt, setzen sich aus einer inadäquaten Reaktion auf anti-proliferative oder pro-apoptotische Signale zusammen, die sich in der Unterdrückung von Apoptose und einer ungehinderten Proliferation äußern. Bedingt durch schnelles Wachstum kommt es im Tumorgewebe rasch zu einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung. Tumorzellen besitzen jedoch die Fähigkeit zur Angiogenese. Ebenfalls ist es Tumorzellen durch Migration möglich, den ursprünglichen Zellverband zu verlassen und anliegendes Gewebe zu invadieren. 2011 wurden diese sechs Merkmale von Hanahan und Weinberg um zwei weitere ergänzt (74). Laut Definition sind Tumorzellen ebenfalls in der Lage, den Zellstoffwechsel umzuprogrammieren und diesen für eine neoplastische Proliferation zu optimieren. Zudem können sich Tumorzellen Mechanismen zu Nutze machen, die eine vollständige Eliminierung durch das Immunsystem verhindern (75). Davon sind vor allem T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Natürliche Killer (NK)-Zellen, betroffen. Die im Tumormilieu vorherrschende Inflammation, deren Wirkung eigentlich der Wundheilung und der Bekämpfung von Infektionen angedacht ist, fördert im Tumorgewebe, zusammen mit einer durch Mutationen bedingten genetischen Instabilität, die acht Merkmale von Tumorzellen und die Tumorprogression.



**Abbildung 6** *Hallmarks of Cancer* von Hanahan und Weinberg. Modifiziert nach (74).



### 1.3 Antitumorale Immunantwort

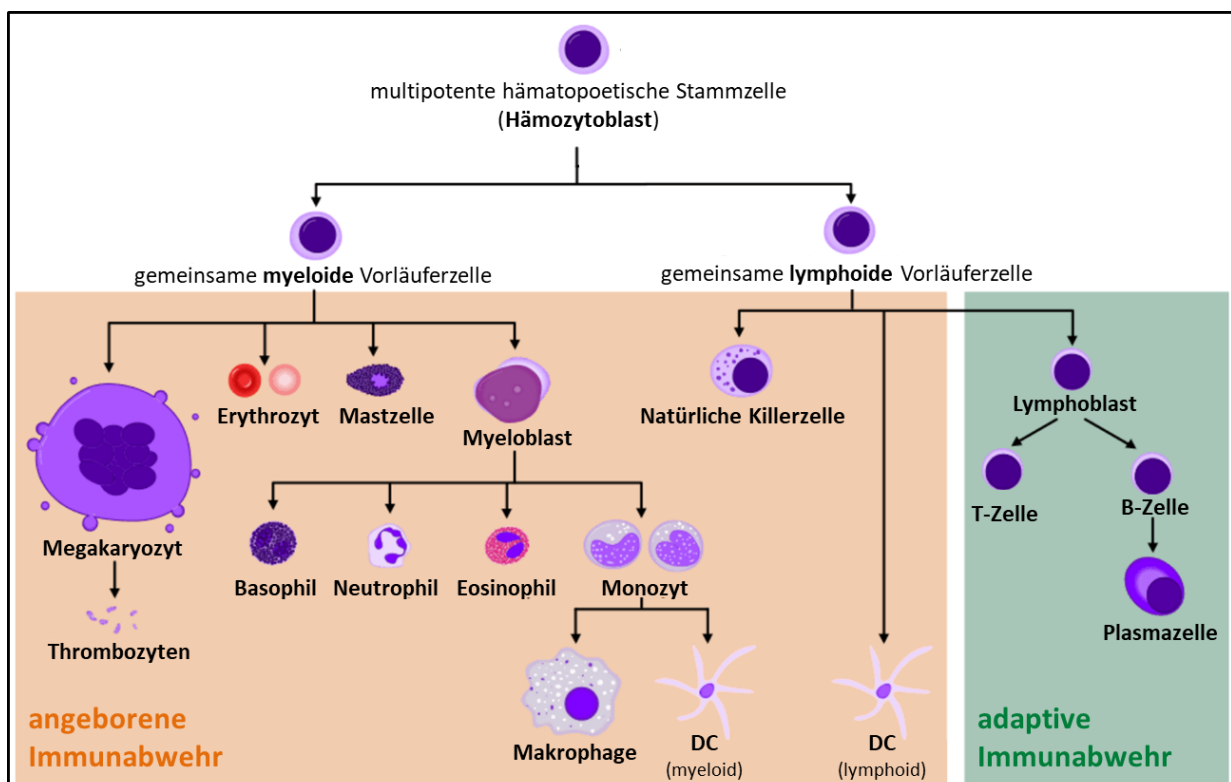
Um neue therapeutische Ansätze für nachhaltige Therapien zu finden, ist es von großer Bedeutung zu verstehen, wie das Immunsystem antitumorale Immunantworten generiert und welche Prozesse bei der Entstehung und Progression eines Tumors fehlreguliert sind.

Die erste Hypothese, die postuliert, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle für die Bekämpfung von Tumoren spielt, wurde 1909 von Paul Ehrlich aufgestellt. Zu dieser Zeit war noch wenig über die Bestandteile und Wirksamkeit des Immunsystems bekannt. Es fehlte ebenso an experimentellen Erkenntnissen, um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Erst etwa 50 Jahre später konnten Lewis Thomas und Sir Macfarlane Burnet diese Hypothese bestärken. Sie nahmen an, dass durch die Entwicklung von Neoantigenen eine Immunantwort provoziert wird, die einer Entstehung von Tumoren entgegenwirkt. Bald darauf wurde die Theorie der *immune surveillance* formuliert (83). Zu dieser Zeit gab es auch viele Gegner dieser Hypothese. Doch als in den frühen 90ern begonnen wurde, an immundefizienten Mäusen zu forschen, konnte endgültig bewiesen werden, dass eine ineffektive Immunantwort unwillkürlich zu einer spontanen Entstehung von Tumoren führt (84,85).

Heute wird angenommen, dass das Immunsystem hauptsächlich auf drei Arten die Entstehung von Tumoren verhindert: Zum einen indirekt, durch die Eliminierung von viralen Infektionen, wie HPV, die vor allem im HNSCC mit einer Tumorentwicklung in Verbindung gebracht werden. Oder durch die Eliminierung von Pathogenen, die zu einer starken Entzündung des Gewebes und damit zu einer potenziellen Entstehung von Mutationen führen können. Zum anderen kann eine Tumorentstehung und Progression durch die direkte Eliminierung von entarteten, körpereigenen Zellen verhindert werden. Diese werden durch TAA, sowie Moleküle die durch zellulären Stress induziert wurden, detektiert (86).

Die Bestandteile des Immunsystems, dargestellt in **Abbildung 7**, gehen aus einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks hervor. Diese können sich zu myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren. Lymphoide Vorläuferzellen differenzieren weiter in eine Vielzahl von Zellen, die in ihrer Gesamtheit die angeborene und adaptive Immunabwehr darstellen. Zur angeborenen Immunabwehr zählen zytotoxische Lymphozyten, wie NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie die Dendritischen Zellen (DC). Diese Zellen bilden die erste auftretende Immunabwehr, sowohl gegen körperfremde Pathogene als auch gegen entartete, körpereigene Zellen. Die angeborene Immunabwehr tritt schnell, aber unspezifisch ein.

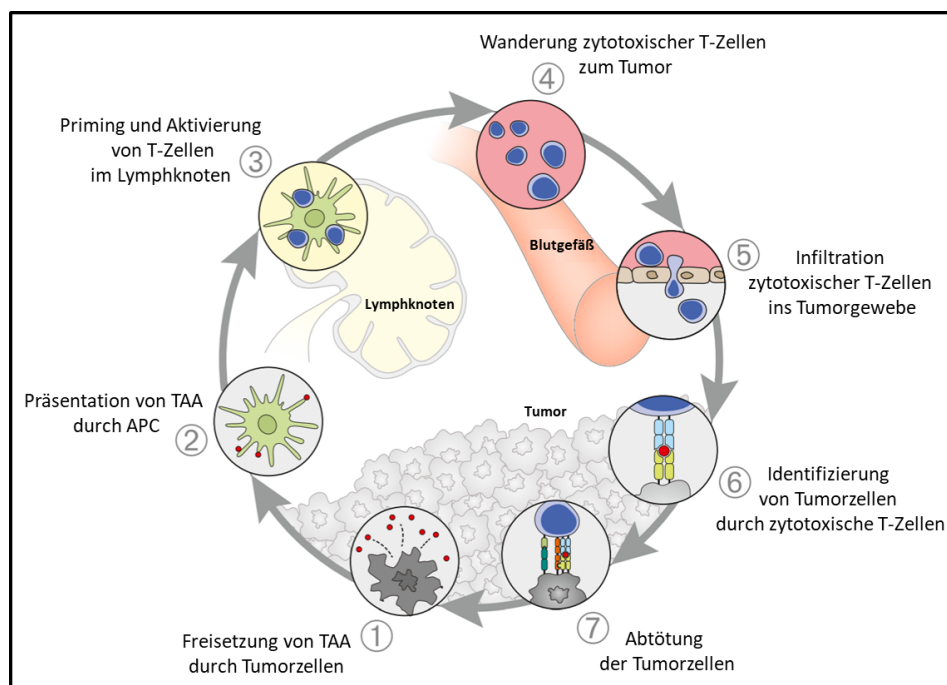
Das Gegenstück dazu stellt die adaptive Immunantwort dar. Sie besteht aus T-Lymphozyten, wie CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und T<sub>regs</sub>. Außerdem sind auch B-Lymphozyten beteiligt, welche hauptsächlich für die Bildung von Antikörpern verantwortlich sind. Die adaptive Immunantwort ist spezifisch, tritt aber verzögert ein. Darüber hinaus bietet sie ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis, welches es ermöglicht, sehr rasch und spezifisch auf eine wiederkehrende Infektion der gleichen Art zu reagieren (87,88). Bei der Bekämpfung maligner, entarteter Tumorzellen ist sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr beteiligt.



**Abbildung 7** Übersicht über die Hauptbestandteile des Immunsystems und ihrer Abstammung, unterteilt in angeborene und adaptive Immunabwehr. Modifiziert nach (89).

Um eine effektive Antitumor-Immunreaktion zu generieren, durchlaufen die beteiligten Immunzellen eine Reihe von streng regulierten Prozessen. Diesen Ablauf bezeichneten Chen und Mellman als *cancer-immunity cycle*, der in **Abbildung 8** dargestellt ist (90).

Die Immunantwort beginnt mit der Präsentation von TAA, die infolge von Mutationen und Onkogenese entstanden sind, durch Tumorzellen. Diese TAA werden von APC internalisiert und prozessiert. Über MHC-I und MHC-II Moleküle werden diese Antigene T-Zellen präsentiert. Im Lymphknoten findet das sogenannte *priming* und die Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten (engl.: *cytotoxic T lymphocyte*, CTL) statt. Dies ist ein entscheidender Schritt für die Effektivität der Immunantwort. Denn hier wird eine Balance zwischen der Aktivierung von T-Effektorzellen gefunden, die den Tumor eliminieren und  $T_{\text{regs}}$ , die dem entgegenwirken. Die aktivierten T-Effektorzellen wandern über Blutgefäße bis zum Tumor und infiltrieren dort das Tumorgewebe. Durch die Interaktion von T-Zell-Rezeptor (engl.: *T cell receptor*, TCR) und MHC-I Molekülen der Tumorzellen werden die präsentierten TAA erneut erkannt und die Tumorzellen eliminiert. Die Eliminierung der Tumorzellen erfolgt auch durch NK-Zellen. Durch Abtöten der Tumorzellen werden wiederum neue TAA freigesetzt, was die Immunantwort noch weiter verstärkt.

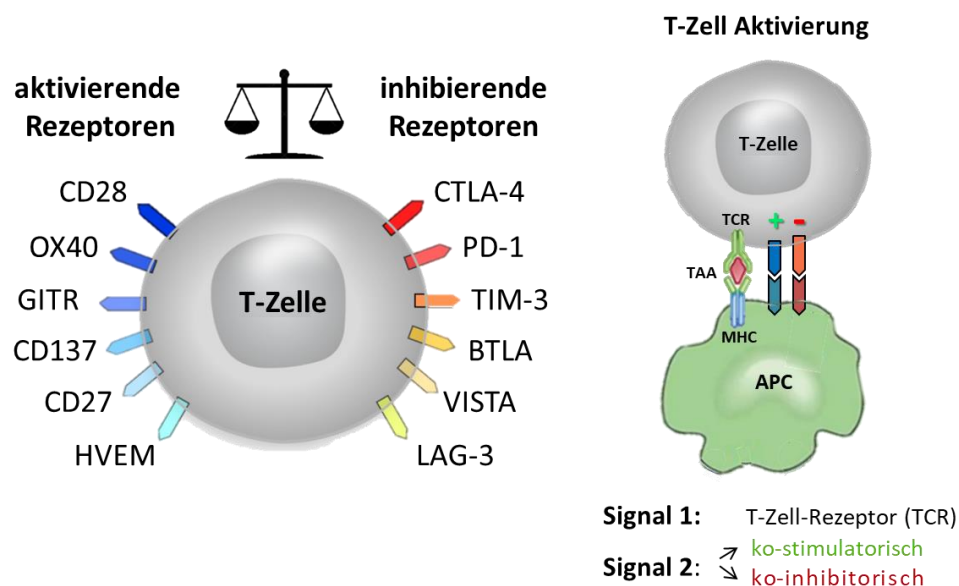


**Abbildung 8** Generierung einer Antitumor-Immunantwort in sieben Schritten, die mit der Freisetzung von TAA beginnt und mit der Eliminierung der Tumorzellen endet. Die einzelnen Schritte sind in der Abbildung beschrieben, zusammen mit der Lokalisation, an der sie stattfinden. Dieser Zyklus kann sich durch immun-stimulatorische Faktoren selbst stimulieren, genauso wie durch inhibitorische Mechanismen unterbrochen werden. Modifiziert nach (90).

### 1.3.1 Immuncheckpoints

Zu Beginn einer Immunantwort befindet sich nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl an T-Lymphozyten im Körper. Sobald die Immunantwort initiiert wurde, beginnen spezifische T-Lymphozyten zu proliferieren. Würde man von anfänglichen 1000 T-Zellen im Körper ausgehen, können nach etwa einer Woche mehrere Millionen T-Zell-Klone für den Angriff generiert werden. Um überschießende Immunantworten zu verhindern und deswegen die Immunantwort rechtzeitig zu stoppen, oder gar um die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, die durch fehlerhafte und vorschnelle Aktivierung einer Immunantwort auftreten können, ist dieser Prozess sehr streng reguliert (91).

Allein zur vollständigen Aktivierung einer T-Zelle werden immer zwei Signale benötigt. Ein Signal wird über den TCR vermittelt. Dieser interagiert mit Antigen-Peptiden, die über MHC-Moleküle präsentiert werden. Diese Interaktion stellt die Antigen-Spezifität sicher. Ein weiteres Signal wird durch einen Ko-Rezeptor vermittelt. Dieses Signal kann entweder stimulatorisch sein und die T-Zelle aktivieren, oder inhibitorisch, was eine Aktivierung verhindern würde. Solche sogenannten Immuncheckpoints sind essenziell für eine Homöostase im gesunden Organismus. Heute sind zahlreiche solcher stimulatorischen und inhibitorischen Ko-Rezeptoren bekannt. **Abbildung 9** gibt eine Übersicht bekannter Rezeptoren, die aktuell auch Gegenstand der Forschung sind.



**Abbildung 9** Auswahl an T-Zell aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, die aktuell Ziel einer Immuncheckpoint-Antikörpertherapie darstellen. Neben der spezifischen Antigen-Erkennung durch den TCR wird die T-Zell-Aktivierung durch ein Gleichgewicht positiver und negativer Signale reguliert, die von Ko-Rezeptoren vermittelt werden. Diese Oberflächenproteine sind typischerweise Mitglieder der TNF-Rezeptor- oder der B7-Superfamilien. Modifiziert nach (92).

### 1.3.2 PD-1 und PD-L1

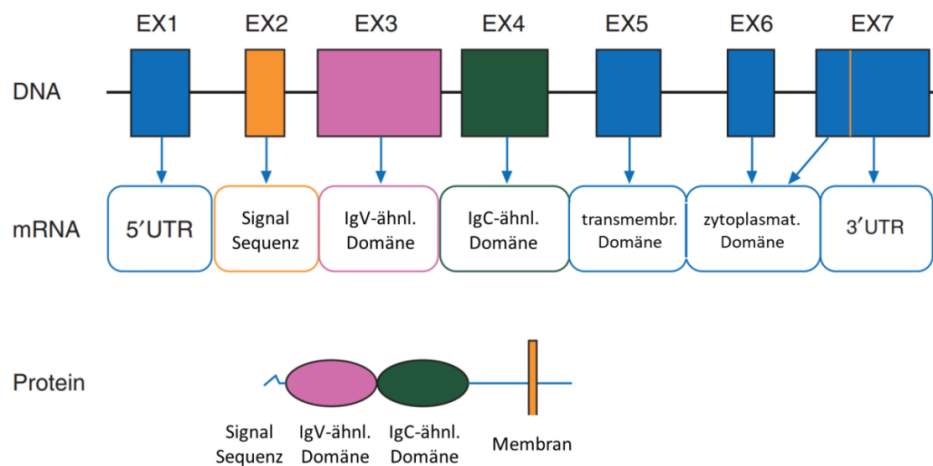
Arlene Sharpe und Tasuko Honjo untersuchten in Knockout-Mäusen näher die Funktion solcher inhibitorischen Signale. Sie fanden heraus, dass der PD-1 Signalweg eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Immuntoleranz und der Abschaltung des Immunsystems nach erfolgter Immunantwort spielt und der zudem vor Gewebeschädigung schützt, die bei sehr starken Immunantworten auftreten kann (93,94).

Seinen Namen erlangte der Rezeptor PD-1 von der Arbeitsgruppe Tasuko Honjos, wo er 1992 entdeckt wurde. PD-1 wurde in CD3-aktivierten Hybridoma T-Zellen geklont, die daraufhin den aktivierten Zelltod induzierten. Aufgrund dieser Beobachtung wurde dieser Rezeptor *Programmed-Death-1* genannt (95). Heute ist bekannt, dass PD-1 nicht direkt für die Induktion von Apoptose, durch die Aktivierung von Caspasen oder Fas-Molekülen verantwortlich ist. PD-1 hat einen eher indirekten Einfluss auf die Vermittlung des Zelltods, durch die Beeinflussung von Zytokin-Expressionen und der Expression von Überlebens- und anti-Apoptosemarkern, wie Bcl-xL und BIM (96).

PD-1 hat zwei Liganden: PD-L1, auch genannt B7-H1 und PD-L2, auch benannt B7-DC. Beide sind Transmembranproteine der B7-Familie. Diese beiden Liganden wurden im Jahre 1999 und 2000 mitunter von Gordan Freeman entdeckt (97,98). Während die Expression von PD-L2 weitgehend auf APC beschränkt ist, wird PD-L1 auf vielen Zelltypen, einschließlich T- und B-Zellen, Monozyten, APC und Epithelzellen exprimiert und als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , induziert (99,100). Obwohl die Interaktion von PD-L2 mit PD-1 im Vergleich zur Interaktion von PD-L1 mit PD-1 eine 2x-6x höhere Affinität aufweist, aber seltener auftritt, wird PD-L1 als primärer Ligand von PD-1 angesehen (101). Auch PD-L1 in Exosomen (102) und lösliche Formen des PD-1 Rezeptors und des PD-L1 Liganden, sPD-1 und sPD-L1, (s für engl.: *soluble*) konnten im Blut von Patienten mit Tumoren nachgewiesen werden. Die genaue Rolle und Funktion von sPD-1 und sPD-L1 ist allerdings noch nicht vollständig erforscht (103).

Das Gen CD274, das für PD-L1 codiert, ist auf Chromosom 9p24.1 lokalisiert und enthält sieben Exone. Das PD-L1-Protein besteht aus insgesamt 290 Aminosäuren (AA) und hat ein Molekulargewicht von 33,275 Kilodalton (kDa). Voraus geht ein Signalpeptid von AA 1-19. Danach setzt sich das Transmembranprotein aus insgesamt drei Domänen zusammen: einer extrazellulären Domäne von AA 19-238, die den größten Teil des Proteins einnimmt, einer transmembran-Domäne helikaler Struktur von AA 239-259 und einer kurzen zytoplas-

matischen Domäne von AA 260–290. PD-L1 besitzt eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Struktur. Von AA 19-127 entspricht die Struktur von PD-L1 einem Ig-V (engl.: *variable*)-ähnlichen Typ und von AA 133-225 einem Ig-C2 (engl.: *constant*)-ähnlichen Typ. PD-L1 besitzt zwei Disulfidbrücken und kann an vielerlei Stellen posttranslational modifiziert werden (104). Zum einen durch Glykosylierung an AA 35, 192, 200 und 219 der extrazellulären Domäne. Dabei handelt es sich bei allen um N-Glykosylierungen an Asparagin. Des Weiteren kann PD-L1 an seiner extrazellulären Domäne, an Threonin180 und Serin184, phosphoryliert, sowie acetyliert und ubiquitinyliert werden (105). Von PD-L1 sind noch zwei weitere Isoformen bekannt, die durch alternatives *Splicing* entstehen, bestehend aus 176 AA mit 20,246 kDa und aus 178 AA mit 20,454 kDa (106). **Abbildung 10** zeigt schematisch die sieben Exone der codierenden DNA-Sequenz für PD-L1, die in mRNA transkribiert wird, sowie eine Übersicht mit den Domänen des translatierten PD-L1-Proteins.



**Abbildung 10** PD-L1-Gen-, -mRNA- und -Proteinstruktur. Das PD-L1-Gen besteht aus sieben Exonen, wobei Exon 1 für die 5'UTR und Exon 2-6 für die Signalsequenz, die IgV- und IgC-ähnliche Domäne, die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne codieren. Exon 7 codiert einen Teil der intrazellulären Domäne und der 3'UTR. Das PD-L1-Protein enthält eine Signalsequenz, eine Transmembrandomäne und zwei extrazelluläre IgV- und IgC-ähnliche Domänen. Modifiziert nach (107).

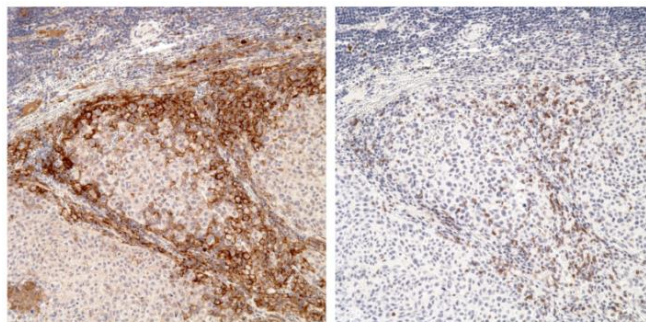
Eine Bindung der beiden Liganden PD-L1 oder PD-L2 an den Rezeptor PD-1 führt zur Phosphorylierung von Tyrosinmotiven der zytoplasmatischen Domäne des PD-1 Rezeptors. Dadurch werden Phosphatasen wie SHP-2 rekrutiert. Dies führt zur Unterbindung verschiedener Signalkaskaden und zu einer Umprogrammierung der T-Zelle. Letztendlich führt dies zu einer herabgesetzten TCR-Aktivität, einer verminderten Zytokin-Produktion, einer geringeren Lymphozyten-Motilität und einer Verhinderung der Lyse krankhafter Zellen. Längerfristige oder starke Inhibition durch inhibitorische Liganden führen sogar zur Anergie und letztendlich zum programmierten Zelltod der T-Zelle (100).

### 1.3.3 Tumor immune escape

Shankaran und Kollegen konnten 2001 im Mausmodell zeigen, dass der Selektionsdruck, den das Immunsystem auf den Tumor ausübt, die Tumoreigenschaften modifizieren kann, auch genannt *cancer immunoediting* (108). Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) zeigen, dass vor allem HNSCCs viele unterschiedliche Wege finden, um sich bereits der Detektion und letztendlich auch dem Angriff durch das Immunsystem zu entziehen. Mechanismen, die die Detektion von HNSCCs durch Immunzellen verhindern, sind beispielsweise die Herunterregulation von MHC-Molekülen oder die Modifikation von Signalkaskaden, die die eine Detektion durch das Immunsystem zulassen (109). Zudem ist es möglich, dass im Tumorgewebe Zellen vorhanden sind, die die Fähigkeit zur Sezernierung von Stoffen besitzen, die zu einem immunsuppressiven Tumormilieu beitragen.

Ebenfalls 2001 gaben Freeman und Kollegen bekannt, dass die immunsuppressiven Liganden PD-L1 und PD-L2 nicht nur von APC exprimiert werden, sondern auch von Zelllinien solider Tumoren, um dort als eine Art Schild des Tumors gegen das Immunsystem zu fungieren (98,110). Zwar wurde die sogenannte Tumor-induzierte Immunsuppression erstmals 1983 von JA Roth beschrieben (108,111), doch zu diesem Zeitpunkt trugen Freeman und Kollegen wesentlich dazu bei, den Mechanismus hinter der Tumorsuppression aufzuklären. So sind auch Tumorzellen in der Lage inhibitorische Liganden zu exprimieren und sich damit die Eigenschaft der T-Zell-Inhibition zu Nutze zu machen. Auf diesem Weg greifen Tumorzellen in die streng regulierten Prozesse des Immunsystems ein, was die Immunantwort gegen maligne Zellen abschwächt und Tumorwachstum begünstigt – der sogenannte *tumor immune escape*.

Etwa in 30 % der soliden Tumoren und im Falle einiger hämatologischer Erkrankungen wird PD-L1-Exprimiert. In den meisten Tumorpatienten inhibiert PD-L1 die Immunantwort lokal. **Abbildung 11** zeigt eine IHC-Färbung eines Melanoms. PD-L1-positive Zellen sowie T-Lymphozyten sind gemeinsam am Tumorrand lokalisiert. Hier werden CTL an der Infiltration in das Tumorgewebe gehindert und die Antitumor-Immunantwort inhibiert (112).



**Abbildung 11** Die IHC-Färbung eines Melanoms veranschaulicht die lokale Inhibition der Immunantwort (112).

## 1.4 Therapie

Im Allgemeinen bringt eine frühe Diagnose und somit eine frühe Behandlung von Karzinomen im Kopf-Halsbereich die besten Überlebenschancen (113). Etwa ein Drittel der HNSCCs wird in Stadium I oder II diagnostiziert. Die Heilungschancen in Stadium I liegen bei 80 % und im Stadium II bei 65 % (114). Doch tatsächlich werden die meisten HNSCCs erst in Stadium III oder IV diagnostiziert (115). Für diese Patienten liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 50 % (65) und die Heilungschancen bei 30 % (114). Für Patienten mit R/M HNSCC liegt das mediane Gesamtüberleben trotz Therapie bei 6-9 Monaten (116). Patienten mit HPV-positiven Tumoren haben insgesamt eine bessere Prognose als Patienten mit HPV-negativen Tumoren. HPV-negative Tumoren zeigen sich sehr sensitiv gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (117,118). Das Risiko für lokoregionäre Rezidive liegt bei Patienten mit HNSCC bei etwa 30-40 %. 10 % der Patienten entwickeln Fernmetastasen (119). Unbehandelt verstirbt die Hälfte der Patienten mit metastasierendem Tumor bereits vier Monate nach der Diagnose (115).

Trotz multimodaler Therapie (Resektion, Radiatio, Radiochemotherapie, palliative Systemtherapie) liegt das 5-Jahres-Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich im lokal-begrenzten und lokal-fortgeschrittenen Stadium zusammengekommen, bei lediglich 50-60 % (2). Bis heute ist nicht geklärt, weshalb die Radio- oder Chemotherapie bei einigen Patienten zu einer Remission des Tumors führt, während bei anderen Patienten ein Ansprechen des Karzinoms auf die Therapie ausbleibt.

Ein besseres Verständnis über die neu entwickelten Immuntherapien, eine sorgfältige Auswahl an Patienten, die für diese Therapieform geeignet sind und eine Auswahl geeigneter Biomarker, sind erforderlich, um eine bessere Versorgung zu ermöglichen. Vor allem für die Behandlung von Patienten mit R/M HNSCCs müssen dringend neue Therapieansätze gefunden werden, die wirksam und verträglich zugleich sind. Möglicherweise kann die Immuntherapie diesen gewünschten Erfolg bringen (120).



### 1.4.1 Standardtherapie von HNSCCs

Abhängig von der Lokalisation des Tumors und des Tumorstadiums werden unterschiedliche Therapien für die Behandlung angewandt. Die operative Entfernung der Tumoren ist die Standardtherapie für Patienten mit HNSCCs in Anfangsstadien. Eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie wird für operable Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit hohem Risiko eines Rezidivs empfohlen (121).

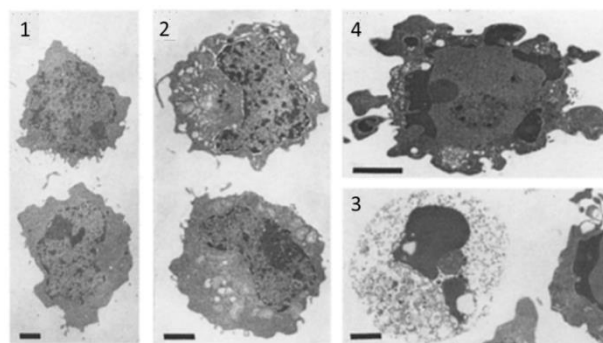
Bezüglich Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (OSCC) werden in den Stadien I und II Primärtumoren im Mundboden und Zungenbereich hauptsächlich chirurgisch entfernt. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit der Metastasierung wird die operative Entfernung von OSCCs in Stadium II häufig mit der Entfernung von Hals-Lymphknoten kombiniert. Diese werden in einer Operation genannt *neck dissection* entfernt (116). Die Bestrahlung von OSCCs am Mundboden erzielt ähnlichen Erfolg wie die chirurgische Entfernung des Tumors, allerdings mit größeren Nebenwirkungen (122). Tumoren im Retromolarenbereich invadieren häufig und auch schon in frühen Stadien in den Ober- und Unterkieferknochen (123). Die Therapie dieser Tumoren besteht ebenfalls aus der chirurgischen Entfernung inklusive der Resektion betroffener Kieferbereiche, sowie der Bestrahlung des Areals. In den Stadien III und IV wird die Therapie bei operablen Tumoren in der Regel mit einer Bestrahlung und/oder Chemotherapie kombiniert (116). Als Chemotherapeutika werden Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Docetaxel oder 5-Fluoruracil eingesetzt (124). Patienten mit inoperablen Tumoren werden palliativ mit Chemotherapeutika behandelt. Zunehmend kommt hier die Antikörper (*targeted*)- und Immuntherapie zum Einsatz.

Therapieweisende Biomarker gibt es aktuell wenige. Der EGF-Rezeptor ist ein Mitglied der ErbB-Familie und einer von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen. EGFR ist in vielen Tumoren überexprimiert, so auch in etwa 90 % der HNSCCs (125). Die EGFR-Überexpression begünstigt aggressives Tumorwachstum, Radioresistenz und eine schlechte Prognose (126). Bei der sogenannten zielgerichteten Therapie werden u.a. monoklonale Antikörper gezielt gegen tumorspezifische Marker eingesetzt. Cetuximab ist ein monoklonaler IgG1-Antikörper, der durch die Bindung an den EGF-Rezeptor die Bindung des endogenen Liganden verhindert und somit die Rezeptordimerisierung und die Signalweiterleitung unterbindet. 2006 wurde Cetuximab zur Behandlung von lokal-fortgeschrittenen HNSCCs, mit geringen Nebenwirkungen durch die Behandlung, von der FDA zugelassen (127). Der EGFR-Inhibitor erhöhte die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant, vor allem in Kombination mit Strahlentherapie (128).

### 1.4.1.1 Induktion von Apoptose als Ziel von Krebstherapien

Ziel von Krebstherapien ist es, durch die Induktion von Nekrose und Apoptose, den Zelltod in Tumorzellen herbeizuführen. Doch auch während der Embryonalentwicklung und zur Aufrechterhaltung von Zellpopulationen in Geweben ist Apoptose ein wichtiger homöostatischer Mechanismus. Der Begriff Apoptose wurde zum ersten Mal 1972 von Kerr, Wyllie und Currie verwendet (129). Im Gegensatz zur Nekrose ist Apoptose eine regulierte Form des Zelltods, auch programmierter Zelltod genannt. Apoptose kann über verschiedene Wege induziert werden: intrinsisch, oder extrinsisch über Todesrezeptoren und den Perforin-Granzym-Signalweg (130).

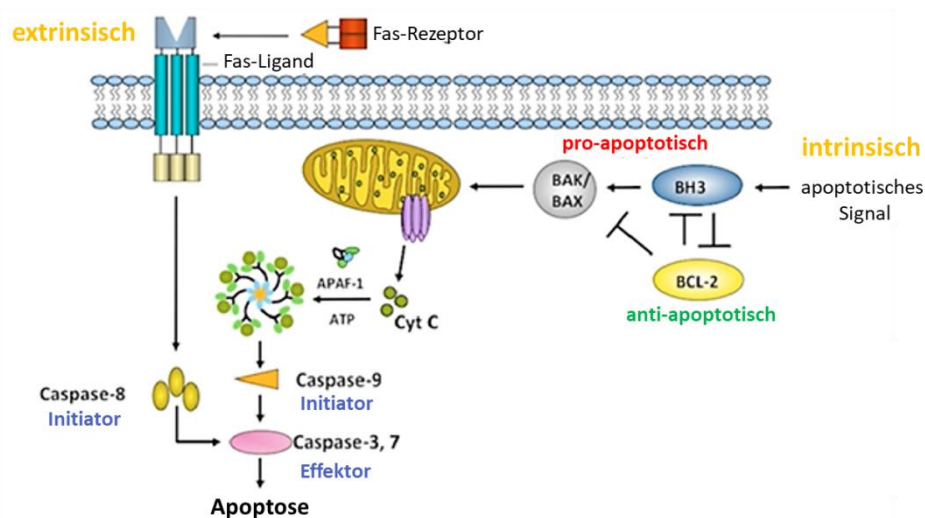
In einer gesunden Zelle herrscht eine Balance zwischen den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X und den pro-apoptotischen Proteinen BAX und BAC. In der vitalen Zelle binden anti-apoptotische Proteine an pro-apoptotische und werden durch diese Interaktion in einen inaktiven Zustand versetzt. Soll Apoptose intrinsisch induziert werden, werden die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X durch die BH3-Proteine BIM, BAD, BID blockiert. Dadurch sind die pro-apoptotischen Proteinen BAX und BAC in der Lage, Poren in der mitochondrialen Membran zu formen. Mitochondriale Substanzen wie Cytochrom-c, diffundieren daraufhin ins Zytoplasma. Cytochrom-c bildet mit dem Protein *Apoptotic protease activating factor* (APAF)-1 einen Komplex, genannt Apoptosom. Dieser Komplex bindet die Initiator-Caspase-9. Diese Caspase aktiviert in einer sog. *Caspase Kaskade* weitere Initiator-Caspasen, die daraufhin die Effektor-Caspasen-3/7 aktivieren. Effektor-Caspasen degradieren DNA und Proteine des Zytoskeletts, wodurch sich auch die Zellmorphologie sichtbar ändert (131). **Abbildung 12** zeigt anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen den Vorgang der Apoptose.



**Abbildung 12** Aufnahmen apoptotischer DO11.10 Hybridomazellen im Elektronenmikroskop. Nach 24 Stunden begann der Prozess der Abschnürung. Zeitliche Abfolge der Bilder in Reihenfolge 1, 2, 3, 4. Der Balken entspricht 2 µm (132).

Nach Induktion von Apoptose werden Zellbestandteile im Zytoplasma verdichtet, Chromatin kondensiert, der Nukleus schrumpft (Pyknosis) und löst sich schließlich auf (Karyorrhesis). Teile der Zelle werden abgeschnürt (*blebbing*) (133). Da diese Abschnürungen (*apoptotic bodies*) von einer intakten Zellmembran umgeben sind, entsteht, im Gegensatz zur Nekrose bei der die Zellmembran porös wird, keine Inflammation im Gewebe. *Apoptotic bodies* exprimieren an der äußeren Zellmembran Phosphatidylserin, ein Aminophospholipid, welches in der vitalen Zelle durch das Enzym Flippase aktiv auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gehalten wird. Kommt es jedoch zur Apoptose, befindet es sich auch auf der extrazellulären Seite (134). Dies wird von Phagozyten erkannt und Phagozytose initiiert (135).

Über den extrinsischen Signalweg erfolgt der Stimulus zur Induktion von Apoptose von außen. Dieser wird vorwiegend über T-Lymphozyten vermittelt. Hier ist eine Rezeptor-Liganden-Interaktion notwendig. Sobald der sogenannte Fas-Rezeptor einer CTL an einen Fas-Liganden der Zielzelle bindet, initiiert die *Fas-associated death domain* (FADD) einen mehrstufigen Prozess. Durch Spaltung wird die Initiator-Caspase-8 aktiviert, die in einer Kaskade weitere Initiator-Caspasen aktiviert, die daraufhin die Effektor-Caspasen 3/7 aktivieren.

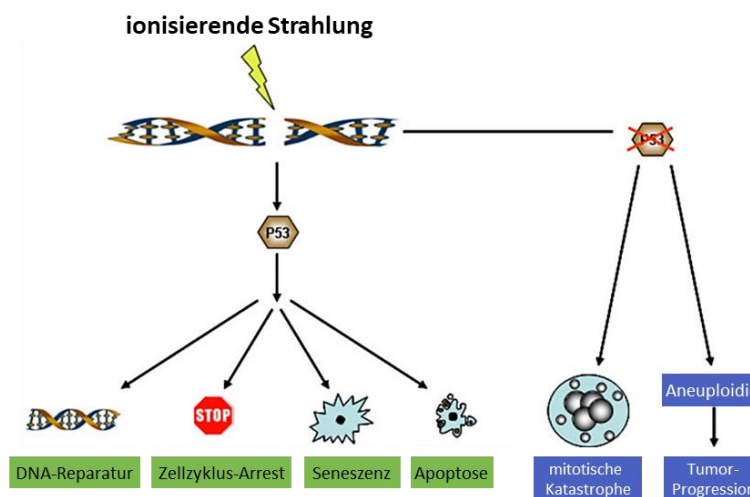


**Abbildung 13** Vereinfachte Darstellung der Apoptose-Kaskade, die über den intrinsischen oder extrinsischen Weg aktiviert werden kann. Modifiziert nach (136).

Ein weiterer extrinsischer Signalweg, der Apoptose induziert, ist der Perforin-Granzym-Signalweg. Dieser wird ebenfalls über CTL vermittelt. CTL bilden mithilfe von Perforin Poren in der Zellmembran der Zielzelle. Von CTL sezerniertes Granzym gelangt über diesen Weg ins Zytoplasma. Dort kann es entweder direkt Effektor-Caspasen aktivieren oder Schäden in der DNA verursachen, die daraufhin indirekt Apoptose induzieren (137).

### 1.4.1.2 Strahlentherapie für HNSCCs

Tumorzellen sind entartete körpereigene Zellen. Da kaum Alleinstellungsmerkmale für eine selektive Therapie bekannt sind, die dabei helfen gesunde Körperzellen von entarteten Zellen zu unterscheiden, macht man sich bei der Strahlentherapie das Prinzip zu Nutze, dass Tumorzellen in der Regel stärker proliferieren als die meisten gesunden Körperzellen. Die Radiosensitivität ist u.a. von der Zellzyklusphase abhängig, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. In der Mitose (M)-Phase sind humane Zellen besonders empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung. In der späten Synthese (S)-Phase hingegen reagieren sie vergleichsweise resistent (138). Ziel der Strahlentherapie ist es, in Tumorzellen eine so hohe Mutationslast zu erzeugen, dass diese Zellen daraufhin Apoptose induzieren. Hierfür wird hoch-energetische, ionisierende Strahlung erzeugt. Molekularbiologisch führt diese Strahlung in der Zelle unter anderem zu DSB der DNA und einem Abbruch des Zellzyklus, wodurch wiederum Seneszenz bzw. Apoptose der Zellen induziert wird (139,140). Dieser natürliche Ablauf kann in Tumorzellen gestört sein, beispielsweise durch Mutation der Transkriptionsfaktors p53, der für die Aktivierung der jeweils notwendigen Signalkaskaden nach DNA-Schädigung verantwortlich ist (141). Ist dieser Ablauf gestört, können Zellen durch einen vorzeitigen Eintritt in die M-Phase eine *mitotische Katastrophe* auslösen oder Aneuploidie erzeugen. **Abbildung 14** veranschaulicht dieses Prinzip.



**Abbildung 14** Die Reaktion der Zelle auf ionisierende Strahlung. Intakte Zellen führen nach Schädigung der DNA einen Zellzyklus-Arrest durch, aktivieren Reparaturmechanismen und induzieren gegebenenfalls Seneszenz oder Apoptose. Eine Mutation im p53-Gen kann hingegen zu einer mitotischen Katastrophe oder Aneuploidie und Tumorprogression führen. Modifiziert nach (139).

#### 1.4.1.2.1 Strahlen-induzierte Signalwege in Tumoren

Unabhängig von DNA-Schäden führt ionisierende Strahlung auch zu Veränderungen von plasmamembranösen-zytoplasmatischen und nukleären Signalkaskaden. Durch Strahlung kommt es zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors, wodurch der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert wird. Akt hat wiederum anti-apoptotischen Einfluss und stimuliert die Reparatur der durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-DSB (142). Im HNSCC scheint eine Blockade dieses EGFR/Akt-Signalwegs sowohl *in vitro* als auch klinisch mit einer erhöhten Radiosensitivität einherzugehen (128,143–145).

Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor c-MET stellt eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase dar, die nach Stimulation Tumorwachstum, Proliferation, Angiogenese und Metastasierung in verschiedenen Typen von soliden Karzinomen induziert (146,147). Unter anderem aktiviert c-MET ebenfalls den PI3K/Akt-Signalweg mit einhergehender zellulärer Resistenz gegenüber strahleninduzierten DNA-DSB beim NSCLC (148,149).

Neben seiner Funktion als Onkogen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von c-MET auch für den Erhalt von Stammzellen durch WNT/ $\beta$ -Catenin vermittelte Transkription essenziell ist (150). Aus diesem Grunde wurde c-MET als Marker für Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften in HNSCCs postuliert (151,152). Entsprechend der Tumorstammzell-Hypothese sind Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften für die Tumoringitiation, Repopulation und Selbsterneuerung verantwortlich. Deshalb muss es Ziel der Strahlentherapie sein, auch diese Zellen zu eliminieren (153). Aufgrund der langsameren Zellteilung können sich die Tumorstammzellen jedoch der strahleninduzierten Apoptose entziehen und werden nach erneuter Repopulation für das Auftreten eines Rezidiv verantwortlich gemacht (153). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Tumorstammzellen während der Bestrahlung die Fähigkeit der Tumorzellen zur DNA-Reparatur erhöhen (154,155). Ziel ist es, diese Tumorstammzellen zu identifizieren. Dies erfolgt derzeit über spezifische Oberflächenmarker. Als Krebsstammzellmarker für HNSCCs gelten CD44, c-MET und CD133. Vielversprechend scheint die Selektion über das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH 1) zu sein (156,157).

#### 1.4.1.2.2 Fraktionierte Strahlentherapie

Um die größte Effektivität bei geringsten toxischen Nebenwirkungen zu erzielen, wird bei der Strahlentherapie die Strahlung in fraktionierten Einzeldosen verabreicht. Bei der Behandlung von HNSCC wird in der Regel eine Gesamtdosis von 60-70 Gy in Einzeldosen von  $\pm 2$  Gy über einen Zeitraum von 5-7 Wochen verabreicht (158). Die fraktionierte Radiotherapie basiert auf dem Prinzip der vier „R“: *reassortment*, *repair*, *reoxygenation* und *repopulation* (159), die später um ein „R“ für *radiosensitivity* ergänzt wurden (160).

Auch wenn die Bestrahlung lokal begrenzt werden kann, sind auch immer gesunde Zellen von der Bestrahlung betroffen. Da Tumorzellen häufig mutationsbedingt defekte DNA-Reparaturmechanismen besitzen, können gesunde Zellen DNA im Allgemeinen besser reparieren. Gesunden Zellen wird zwischen den einzelnen Fraktionen die Möglichkeit zur DNA-Reparatur gegeben (*repair*).

Tumorzellen, die nicht ausreichend stark durch die Bestrahlung beschädigt wurden, können sich der Induktion von Apoptose entziehen, proliferieren und können eine neue Zellpopulation ausbilden. Um die Entstehung neuer Zellpopulationen zu unterbinden, muss jede Faktion mehr Schaden in Tumorzellen anrichten als die vorherige. Gesunde Zellen sollen jedoch nach der DNA-Reparatur wieder proliferieren (*repopulation*).

Zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden sich die Zellen sehr wahrscheinlich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Eine fraktionierte Radiotherapie erhöht die Wahrscheinlichkeit Tumorzellen in ihrer radiosensitiveren M-Phase zu bestrahlen und dadurch größtmögliche DNA-Schädigung zu erzielen (*reassortment*).

Bestrahlung verursacht neben der direkten DNA-Schädigung auch indirekten Schaden durch die Bildung freier Radikale aus Sauerstoff. Tumoren bilden bei hoher Zelldichte hypoxische Zentren aus, Bereiche, die mit Sauerstoff unterversorgt sind. In diesen Bereichen finden sich nach Bestrahlung weniger Superoxid-Radikale als im restlichen Gewebe. Sobald zuerst sauerstoffreiche Tumorbereiche durch die hohe Anzahl freier Radikale als Folgeerscheinung der Radiotherapie eliminiert wurden, ist mehr Raum für die verbliebenen Tumorzellen verfügbar. Diese werden wieder stärker mit Sauerstoff versorgt, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, diese Zellen bei der nächsten Bestrahlungssitzung durch die zusätzliche Bildung freier Radikale zu eliminieren (*reoxygenation*).

### 1.4.2 Verträglichkeit unterschiedlicher Therapieformen

Ziel ist es, für HNSCCs Therapien mit hoher Wirksamkeit und geringer Toxizität zu finden.

Bei der Chemotherapie werden ein oder mehrere Medikamente eingesetzt, die typischerweise auf sich schnell teilende Tumorzellen abzielen. Nebenwirkungen entstehen durch die Beeinträchtigung gesunder Zellen, insbesondere solcher, die sich ebenfalls schnell teilen. Betroffen sind daher Haarfollikel, Zellen im Knochenmark und des Magen-Darm-Trakts. Häufige Nebenwirkungen einer Chemotherapie sind Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen, Leukopenie, Neutropenie, Anämie, und/oder Thrombozytopenie, Diarrhö und Mukositis. Einige Chemotherapeutika, vor allem Cisplatin, zeigen besonders starke toxische Nebenwirkungen (161).

Auch die Strahlentherapie macht sich das Prinzip der schnellen Proliferation von Tumorzellen zu Nutze, kann jedoch lokal begrenzt eingesetzt werden. Die Behandlung mit ionisierender Strahlung kann mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sein. Dabei kann es zur Entwicklung einer Osteoradionekrose, Xerostomie durch Beschädigung der Parotis, Verlust von Zähnen und Entzündungen der Mundschleimhaut kommen. (67).

Zielgerichtete Krebstherapien wirken spezifisch. Im Allgemeinen wird erwartet, dass diese Medikamente darum weniger Nebenwirkungen auf normale Zellen haben. Aber auch bei zielgerichteten Therapien können, abhängig vom Angriffsziel, starke Nebenwirkungen auftreten. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Diarrhö, Leberprobleme, Hautreizungen, Herzprobleme und Bluthochdruck (161).

Da es bei der Immuncheckpoint-Inhibition zu einer Blockade des körpereigenen Schutzes vor überschießenden Immunreaktionen kommt, können auch normale Gewebe beeinträchtigt und autoimmune Nebenwirkungen verursacht werden. Diese umfassen ein Nebenwirkungsspektrum, das sich von dem einer Chemotherapie und zielgerichteten Krebstherapie unterscheidet und andere Behandlungsstrategien erfordert. Infolge einer Therapie können alle Organe oder Gewebe von Nebenwirkungen betroffen sein. Aber am häufigsten sind die Haut, Kolon, Lunge, Leber und endokrine Organe, wie Hypophyse oder Schilddrüse betroffen. Die meisten immunbedingten Nebenwirkungen sind leicht bis mäßig und reversibel (162).

Trotz möglicher Nebenwirkungen bietet die Immuntherapie als einzige Therapieform, auch für Patienten mit R/M HNSCC, nachhaltig eine bessere Prognose mit höherer Lebensqualität (163,164).

### 1.4.3 Immuntherapie als Hoffnungsträger

2003 zeigten Zhang und Kollegen an Patienten mit Ovarialkarzinomen, dass die Anzahl tumor-infiltrierender CTL mit Überleben der Patienten korreliert (78). Dies konnte mittlerweile für viele weitere Tumorarten bestätigt werden (165–167). Ziel der Forschung ist es nun, Strategien zu entwickeln, die wieder eine effektive Tumor-Eliminierung zulassen (168).

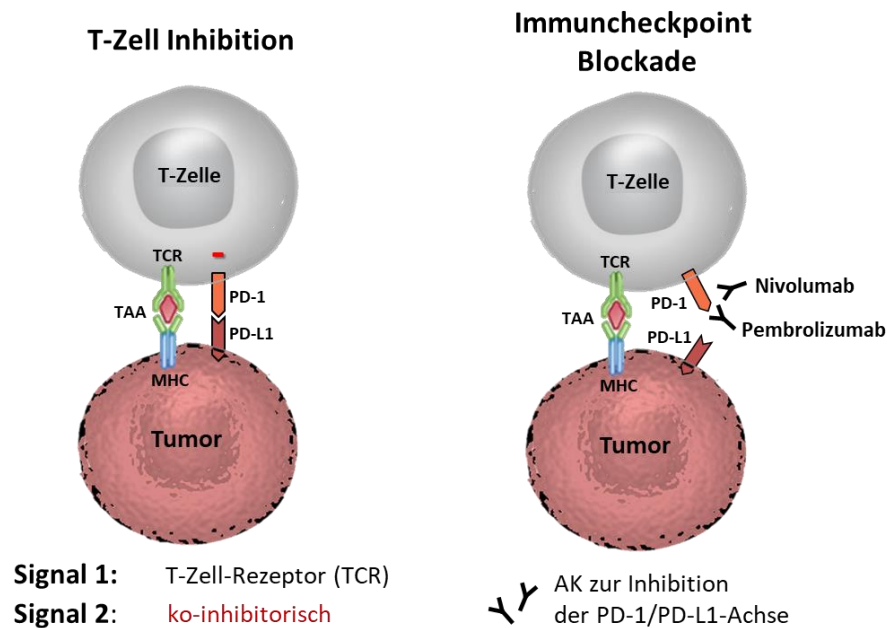
Es wurden Versuche unternommen, die Immunantwort zu stimulieren (169). Doch heute ist bekannt, dass von einer aktivierten T-Zelle sezernierte proinflammatorische Zytokine, wie  $\text{IFN-}\gamma$  beispielweise zu einer ungewollten Induktion der PD-L1-Expression auf Tumorzellen führen und das letztendlich wieder der Eliminierung des Tumors entgegenwirkt.

So entstand die Idee, die Inhibition des Immunsystems zu unterbinden und Immuncheckpoint-Blockaden zu entwickeln. Dies soll eine Infiltration von CTL in das Tumorgewebe ermöglichen, um den Tumor dort ungehindert zu eliminieren. Publik wurde diese Strategie durch den Immunologen James P. Allison. Dieser hatte die Idee, die Interaktion des ko-inhibitorischen Moleküls CTLA-4 mit B-7 Molekülen zu unterbinden. Beim ersten zugelassenen Immuncheckpoint-Inhibitor im Jahr 2011, handelte es sich um Ipilimumab, einem Antikörper zur Blockade von CTLA-4 im inoperablen oder metastasierenden Melanom (170). Diese Interaktion findet im Lymphknoten statt, wo B-7 Moleküle hauptsächlich von APCs präsentiert werden. Anders als bei der Blockade von CTLA-4 findet eine Inhibition der PD-1/PD-L1-Achse direkt in der näheren Tumorumgebung statt (171). Nivolumab, der erste Antikörper zur Blockade des Rezeptors PD-1, wurde 2014 für die Behandlung von inoperablen metastasierten Melanomen zugelassen und mittlerweile auch in der klinischen Phase 3 Studie CheckMate 141 zur Behandlung von Patienten mit R/M HNSCCs getestet (172). Der zweite anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab wurde im Jahr 2016 von der FDA zur Behandlung von Hodgkin Lymphomen zugelassen und wird mittlerweile ebenfalls in der klinischen Phase 3 Studie KEYNOTE-048 zur Behandlung von Patienten mit R/M HNSCCs, die gegenüber einer platinbasierten Therapie refraktär waren, getestet (163).

Seit 2011 wurden insgesamt sieben verschiedene Immuncheckpoint-Inhibitoren unter bestimmten Voraussetzungen zur Behandlung von Tumoren von der FDA zugelassen (3). Tasuku Honjo, Professor an der Universität Kyoto in Japan und Mitglied des wissenschaftlichen Beirats des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie und Epigenetik in Freiburg, erhielt 2018, zusammen mit James P. Allison der Universität Texas in Houston, den Nobelpreis für Medizin. Der Preis wurde zuerkannt für die Entdeckungen in der Krebsbehandlung durch Inhibition der negativen Immunregulation (173).



Diverse Antikörper, die die PD-1/PD-L1-Achse blockieren, wurden bereits in klinischen Studien getestet. Unter ihnen anti-PD-1 Antikörper, wie Nivolumab (BMS), Pembrolizumab (Merck), MEDI-0680 (AstraZeneca), PDR001 (Novatis) und REGN2810 (Regeneron), so wie anti-PD-L1 Antikörper, darunter Atezolimumab (Roche), Durvalumab (AstraZeneca), Avelumab (EMD Serono/Pfizer) und MDY-1105 (BMS). **Abbildung 15** veranschaulicht das Prinzip der Inhibition der PD-1/PD-L1-Achse mit therapeutischen Antikörpern.



**Abbildung 15** T-Zell Inhibition durch die Interaktion des ko-inhibitorischen Liganden PD-L1 der Tumorzelle mit dem PD-1 Rezeptor der T-Zelle. Antikörper (AK), die gegen die PD-1/PD-L1-Achse gerichtet sind, können diese Interaktion unterbinden und somit einer Inaktivierung der T-Zelle entgegenwirken. In diesem Beispiel wurden zwei therapeutische Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab gewählt, die beide den PD-1 Rezeptor blockieren.

Suzanne Topalian und Kollegen publizierten 2012 die erste Phase I Studie zur Blockade der PD-1/PD-L1-Achse mit dem anti-PD-1 Antikörper Nivolumab in unterschiedlichen soliden Tumoren. Die Ansprechrates bei PD-L1-negativen Tumoren war 0 %, die von PD-L1-positiven Tumoren 36 %. Eine Schlussfolgerung daraus war, dass nur Patienten mit PD-L1-positiven Tumoren von einer Blockade der PD-1/PD-L1-Achse profitieren würden (174). Weitere Studien bewiesen allerdings, dass auch Tumoren, die als PD-L1-negativ eingestuft wurden, zum Teil auf die Blockade der PD-1/PD-L1-Achse reagierten. (175,176). Dennoch ist die Ansprechrates generell höher, wenn PD-L1 von den Tumoren selbst und der Tumorumgebung exprimiert wird (10). Dies ist mitunter der Grund, weshalb PD-L1 als prädiktiver Biomarker so umstritten ist.

#### 1.4.4 Mögliche Kombinationstherapien

Bonner berichtete von der Behandlung von lokal-fortgeschrittenen HNSCCs mit hoch dosierter Strahlung in Kombination mit Cetuximab einem EGFR-Inhibitor. Das lokale Tumorwachstum konnte durch die Kombinationstherapie stark begrenzt werden und die Sterblichkeit reduzieren, ohne toxische Nebenwirkungen der Bestrahlung zu erhöhen (128).

Neben dem Einsatz als Monotherapie scheint die Immuncheckpoint-Blockade auch eine synergistische Wirkung mit der Strahlentherapie zu besitzen (177). Mitunter führt die Bestrahlung über eine mTOR-vermittelten Expression von MHC-I-Rezeptoren an der Zelloberfläche zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und stärkt somit die tumorspezifische Immunantwort auch abseits des Bestrahlungsareals, ein sogenannter abskopaler Effekt (178,179). Umgekehrt führt die Bestrahlung über die von den Immunzellen sezernierten proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu einer stärkeren Sezernierung des Immunmodulators PD-L1 (180). Eine Blockade von PD-L1 kann daher wiederum die CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Antitumor-Immunität stimulieren (181). Erste Hinweise auf einen Benefit dieser Kombinationstherapie aus Radio- und Immuntherapie liegen bereits vor (182,183). Die Bedeutung dieses Zusammenhangs wird durch die aktuelle Initiierung einer Reihe klinischer Studien (KEYNOTE, CheckMate, OAK, RTOG 3504, NRG-HN003, ADRISK, Javelin, etc.) verdeutlicht (184,185).

Findet der Prozess der *immune evasion* von Tumorzellen über einen längeren Zeitraum statt, werden zytotoxische T-Zellen dysfunktional und wechseln in einen Zustand der als *T cell exhaustion* bezeichnet wird (186). Charakterisiert wird dieser nicht nur durch die Expression des ko-inhibitorischen Rezeptors PD-1, sondern auch weiterer inhibitorischer Rezeptoren wie TIM-3, CTLA-4, LAG-3 und VISTA (187), welche generell, aber auch im HNSCC, mit dem Verlust zytotoxischer Effektorfunktionen verbunden sind (188). Im Moment wird an möglichen Kombinationstherapien gearbeitet, die neben der Blockade der PD-1/PD-L1-Achse auch andere inhibitorische Moleküle blockieren. Möglich wäre es, verschiedene Immun-Checkpoints gleichzeitig zu inhibieren (189), oder immun-stimulatorische Signalwege durch die Rezeptoren CD137, OX-40, CD27, ICOS und GITR zu aktivieren (190). Reardon und Kollegen zeigten im Mausmodell, dass auch Glioblastome im immunprivilegierten Gehirn, das für das Immunsystem ohnehin schwer zugänglich ist, von einer Kombinationstherapie durch PD-L1 und CTLA-4 stark profitieren (191). Auch eine zusätzliche Gabe von stimulatorischen Zytokinen wie IL-2 oder IL-12 wäre denkbar. Suzuki und Kollegen arbeiten aktuell an Immuncheckpoint-Molekülen auf regulatorischen T-Zellen für eine potentielle Therapie von HNSCC (192).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Behandlung von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im lokal-fortgeschrittenen Stadium erfolgt klassischerweise durch eine operative Resektion des Tumors, in Kombination mit Strahlentherapie. Obwohl sich HPV-positive Tumoren als sehr strahlenempfindlich erwiesen haben und deshalb auch mit einer besseren Prognose einhergehen, sind HPV-negative Tumoren vergleichsweise resistent gegenüber Strahlung (117). Auch um die Überlebensraten von Patienten mit HPV-negativen Tumoren im Kopf-Halsbereich signifikant zu steigern, ist es von großer Relevanz die Mechanismen weiter aufzuklären, die in HPV-negativen Tumoren zur Vermittlung von Radioresistenz führen.

Seit 2011 wurden von der FDA insgesamt sieben Immuncheckpoint-Inhibitoren zugelassen, 2016 auch der erste Antikörper zur Blockade der PD-1/PD-L1-Achse im R/M HNSCC - Nivolumab. Die synergistische Wirkung von Bestrahlung und Immuncheckpoint-Blockade zeigte zum Teil beeindruckende klinische Ergebnisse. Doch nicht alle Patienten profitieren gleich von dieser Therapie (185,193). Mittlerweile gibt es immer mehr Hinweise, dass PD-L1 neben seiner immunmodulatorischen Wirkung auch zellintrinsisch Resistenzen vermittelt. Doch beim HNSCC fehlen bisher jegliche Hinweise auf die intrinsische Signalwirkung von PD-L1 und dessen Einfluss auf die Strahlensensitivität.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von PD-L1 und dessen zellintrinsische Funktionen in HNSCCs näher zu untersuchen, um mögliches Therapieversagen zu erklären und so Ansätze für zukünftige Kombinationstherapien und individualisierte Therapien zu finden. Um die Mechanismen weiter aufzuklären, die in HNSCCs zur Vermittlung von Radioresistenz führen, wurde zunächst ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert, bestehend aus HPV-negativen HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radioresistenz. Diese Zelllinien wurden auf Gen- und Proteinebene auf ihre PD-L1-Expression untersucht. Zudem wurde geprüft ob der Grad der Radiosensitivität mit der Expression von PD-L1 und anderen Tumormarkern korreliert. Es wurde geprüft welchen Einfluss die Bestrahlung auf die PD-L1-Proteinexpression in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radioresistenz nimmt und durch welchen Mechanismus PD-L1 in der Zelle stabilisiert wird. Auch die genaue Lokalisation von PD-L1 vor und nach Behandlung wurde mit verschiedenen experimentellen Methoden geprüft. Der PD-L1-Gehalt wurde mittels siRNA-Knockdown und Plasmid-Überexpression beeinflusst, um in funktionellen Assays die Rolle PD-L1 bei Proliferation, Migration und Invasion im HNSCC zu untersuchen. Auch direkte Bindungspartner von PD-L1 wurden ermittelt, um die involvierten Signalwege bei der Vermittlung von zellulärer Radioresistenz zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die in **Tabelle 1** aufgelisteten, humanen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (engl.: *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC)-Zelllinien PCI 1, PCI 8, PCI 9, PCI 13, PCI 15 und PCI 52 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Theresa L. Whiteside vom Pittsburgh Cancer Institute (PCI) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um adhärenz Keratinozyten. Die im Labor der Universität Pittsburgh etablierten Zelllinien (194,195). stammen alle aus männlichen Patienten, hohen (>65 Jahre) und mittleren Alters (<65 Jahre). Die Zelllinien sind unterschiedlichen anatomischen Ursprungs: PCI 1 - Larynx, PCI 8 - Sinus pyriformis, PCI 9 - Zungengrund, PCI 13 - Retromolarbereich, PCI 15 - Sinus pyriformis, PCI 52 - Plica aryepiglottica. Abgesehen von PCI 8, deren kultivierte Zellen einer Metastase entstammen, wurden PCI 1, PCI 9, PCI 13, PCI 15 und PCI 52 aus einem Primärtumor isoliert. Vor der Entnahme dieser Tumore wurden die Patienten weder mit Radio- noch Chemotherapie behandelt. Alle Zelllinien wurden zuletzt im Juni 2018 durch das Leibniz-Institut (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Berlin, D; A1806475-1) mittels STR-DNA-Typisierung (Nonaplex-PCR) authentifiziert.

**Tabelle 1** Nähere Beschreibung der verwendeten HNSCC-Zelllinien

Zelllinie	anatomischer Ursprung	TNM Status	kultivierte Zellen	vorherige Behandlung	M/W	Alter
PCI 1	Larynx	k.A.	Primärtumor	Resektion	M	65
PCI 8	Sinus pyriformis	T3N0M0	Metastase	keine	M	54
PCI 9	Zungengrund	T4N3M0	Primärtumor	keine	M	56
PCI 13	retromolarer Bereich	T4N1M0	Primärtumor	keine	M	50
PCI 15	Sinus pyriformis	T3N1M0	Primärtumor	keine	M	69
PCI 52	Plica aryepiglottica	T1N2M0	Primärtumor	k.A.	M	k.A.

### 2.1.2 Reagenzien und Lösungen

Reagenz oder Lösung	Hersteller
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Albumin Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Annexin V - APC	ImmunoTools, Friesoythe, D
Annexin V - FITC	ImmunoTools, Friesoythe, D
BIO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V	Biomol, Hamburg, D
Brilliant III ultra fast qPCR master mix	Stratagene Agilent Technol.s, Santa Clara, CA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Buparlisib (BKM120, NVP-BKM120)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
cOmplete, mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Basel, CH
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dharmafect 1	Horizon, Cambridge UK
DMEM	PAN-Biotech, Aidenbach, D
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DPBS 10x (CaCl, MgCl)	Gibco, Carlsbad, CA, USA
DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EnVision + Dual Link System-HRP	DAKO, Agilent Technol., Carpinteria, CA, USA
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum	Gibco , Carlsbad, CA, USA
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Madison, WI, USA
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, D
Goat Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H <sub>2</sub> O DNase und RNasefrei, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magermilch	Carl Roth, Karlsruhe, D
Matrigel®	Corning, NY, USA
Methanol, MeOH	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, NaCl	VWR Chemicals, Randor, PA, USA
Nonidet P40 Substitute	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ponceau S red staining solution	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Premium-Grade-Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce, Thermo Scientific, Rockford, USA
ProteoExtract Subcellular Extraction Kit	Merck, Darmstadt, D
ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution	Merck, Darmstadt, D
RIPA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
Roti Lumin	Carl Roth, Karlsruhe, D
RT <sup>2</sup> Real-Time SYBR Green/Rox PCR master mix	Qiagen, Hilden, D
SigmaFast 3,3' DAB tablets	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Transkriptor First Strand cDNA Synthesekit	Roche Diagnostics, Basel, CH
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Vitro-Clud®	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, D
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, D
YOYO-1	Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D

### 2.1.3 Kits und Arrays

Kit	Hersteller
Bicinchoninsäure (BCA) Assay	Merck, Darmstadt, D
Human Cell Motility RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array	Qiagen, Hilden, D
MTT Cell Proliferation Assay	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
ProteoExtract Subcellular Extraction Kit	Merck, Darmstadt, D
RNeasy-Minikit	Qiagen, Hilden, D
Transkriptor First Strand cDNA Synthesekit	Roche Diagnostics, Basel, CH

### 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller
Akt-1 (B-1)	sc-5298	Santa Cruz Biotechnol. Inc., Dallas, TX, USA.
beta Actin	ab8227	Abcam, Cambridge, UK
E-Cadherin	610182	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
GAPDH	ab9385	Abcam, Cambridge, UK
Goat anti-Mouse IgG	32430	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG	32460	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
GSK-3beta (D5C5Z)	#12456	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
IgG aus Rabbit Serum	I5006	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lamin A/C	#2032	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
Mouse TrueBlot®	18-8817-33	Rockland Immunochem, Pottstown, PA, USA
Na <sup>+</sup> -, K <sup>+</sup> -, ATPase	#3010	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
N-Cadherin	610921	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
p-Akt (Ser473)	#9271	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
PD-L1 (E1L3N)	#13684	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
PE anti-human CD274 (29E.2A3)	329706	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl (MPC-11)	400314	BioLegend, San Diego, CA, USA
p-GSK-3beta (Ser09) (D85E12)	#5558	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
Rabbit TrueBlot®	18-8816-33	Rockland Immunochem, Pottstown, PA, USA
Rho	ab40673	Abcam, Cambridge, UK
Vimentin	#5741	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA

### 2.1.5 siRNA und Plasmide

	siRNA/Plasmid	Hersteller
siRNA	ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (D-001810-10-20)	Horizon, Cambridge UK
	siGENOME Human CD274 siRNA-SMARTpool (M-015836-01-0005)	Horizon, Cambridge UK
Plasmid	CV pcDNA 3.1 (+)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
	PD-L1 pcDNA 3.1 (+)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.1.6 Primer und Sonden

	Primer/Sonde	Hersteller
Primer	18S-Messenger-RNA	TIB Molbiol, Berlin, D
	CD274-Messenger-RNA	TIB Molbiol, Berlin, D
Sonde	TaqMan UPL-Sonde Nr. 48	Roche Diagnostics, Basel, CH

### 2.1.7 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
µMACS Protein A MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
µSäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
24-Well-Platte, Kollagen Typ I Beschichtung	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
24-Well-Platte, Poly-L-Lysin Beschichtung	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
6-Well Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
96-Well Quali-PCR-Platte	Kisker Biotech, Steinfurt, D
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
96-Well-Platte, Fibronectin Beschichtung	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Absaugpipette, 2 ml	Corning, NY, USA
Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K	Merck, Darmstadt, D
Bottle Top Filter, 0,2 µm, 500 ml	Corning, NY, USA
BZO Seal Film	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D
Cedex Smart Slides	Roche Diagnostics, Basel, CH
Cell lifter	Corning, NY, USA



Combitips advanced 0,1 ml, 0,5 ml 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Corning CentriStar ZentrifugenRöhrchen 15 ml, 50 ml	Corning, NY, USA
Eppendorf Pipettenspitzen ohne Filter, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Eppendorf Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Tube 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon® 4-Well Culture Slides	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tubes, 5 mL	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Filter-Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, D
High Precision Deckgläser 1.5H	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Microflex NeoTouch Neoprene	Ansell, Richmond, AUS
Microlance 3 20G Kanüle	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Milan Prospekthüllen glasklar 803	InterES GmbH, Nürnberg, D
NanoLink Streptavidin Magnetic Beads	TriLink Biotechnol., San Diego, CA, USA
Omnifix ® 100 Solo 1,0 ml Spritze	B. Braun, Melsungen, D
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Peha-soft Nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Petrischale, 10 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Precision Plus Dual Color Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PVDF Western Blotting Membrane	Roche Diagnostics, Basel, CH
Reagenz Reservoir 50ml	Corning, NY, USA
Serologische Pipette, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, D
T75-Zellkulturflasche	Corning, NY, USA
ThinCert™ 24 Well, 8,0 µm Poren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Whatman 46x57cm	GE Healthcare GmbH, Solingen, D
Zellschaber 25cm	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, D

## 2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
6-MV-Linearbeschleuniger	Primus, Siemens, Nürnberg, D
8-Kanal Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Brutschrank HERAccl 240	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Cedex XS Analyzers	Roche Diagnostics, Basel, CH
ChemiDoc XRS+ Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Eppendorf Research plus, Einkanalpipette, variable 0,5-10 µl, 10- 100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, J
GENios Plattenphotometer	Tecan Group, Männedorf, CH
HLC Heizblock BT 130-2	DITABIS AG, Pforzheim, D
IKA Magnetrührer RCT Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
IncuCyte Zoom	Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA
Magnetständer	Merck, Darmstadt, D
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN®Tetra Handcast Systems	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Minizentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Nikon E995 Digitalkamera	Nikon, Tokyo, J
Nikon Eclipse TS100 Lichtmikroskop	Nikon, Tokyo, J
Pipetgirl	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, D
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage Talent TE2101	Sartorius AG, Göttingen, D
ProBlot Rocker 25XLD	Labnet International, NJ, USA
Rotator, rotierender Schüttler	Carl Roth, Karlsruhe, D

Schüttelwasserbad 1005	GFL mbH, Burgwedel, D
Schüttelwasserbad 1086	GFL mbH, Burgwedel, D
Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
SIGMA Typ 3K30	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D
Stratagene MX3005Pro	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
thermoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls	BANDELIN electronic, Berlin, D
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wippschüttler Mini-Rocker Typ MR-1	BioSan, Riga, LVA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Zentrifuge Rotanta 320	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D

### 2.1.10 Software

Software	Hersteller
FACSDiva Software 7.0	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Flowing Software 2.5.1	Turku Centre for Biotechnol., Universität Turku, FIN
GraphPad Prism 6/8 Software	GraphPad Inc., San Diego, CA, USA
Image Lab Software 5.2.1	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ImageJ Software 1.8.0	National Institutes of Health, San Jose, CA, USA
IncuCyte ZOOM basic analyzer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
NIS-Elements AR 3.2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
Software Cedex XS	Roche Diagnostics, Basel, CH
Software Magellan 6	Tecan Group, Männedorf, CH
Stratagene MX3005Pro	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### ***2.2.1.1 Kulturbedingungen***

Als Kulturmedium wurde für die HNSCC-Zelllinien DMEM (PAN-Biotech) verwendet. Angereichert wurde dieses mit 10-% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 1 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich). Kultiviert wurden die Zellen im Brutschrank (HERAcell 240, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), bei 37°C in einer befeuchteten 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, um eine optimale Nährstoffversorgung zu garantieren und die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte zu minimieren.

#### ***2.2.1.2 2D-Zellkultur***

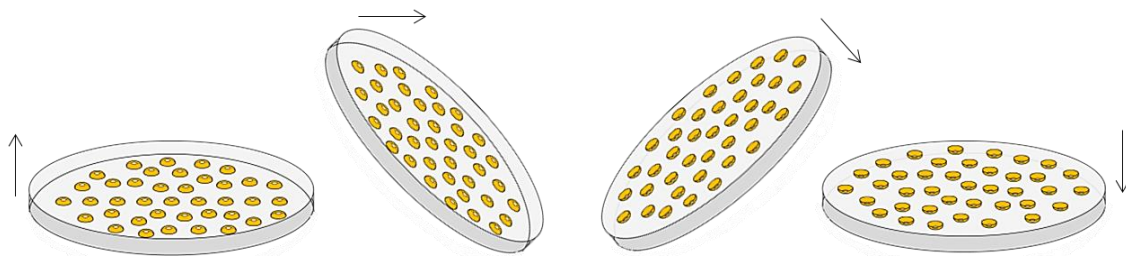
Adhärente Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese nach einmaligem Waschen mit PBS (DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich) mit 0,05%iger Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich) für 5-10 Minuten (Min) bei 37°C im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl in eine neue Flasche überführt. Für das Ablösen der Zellen wurden Inkubationszeiten  $\geq 10$  Min vermieden, um die Zellen vor irreversibler Schädigung der Zellmembran zu schützen.

#### ***2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl***

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellzählgeräts Cedex XS Analyzer (Roche Diagnostics, Basel, CH) automatisiert ermittelt. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension in eine spezielle Zähl-Kammer des Cedex Smart Slide (Roche Diagnostics) überführt. Mit der Software Cedex XS (Roche Diagnostics) wurden vor der Messung die Zellgröße und der Verdünnungsfaktor definiert. Im Anschluss wurde automatisch die Gesamtzellzahl pro Milliliter (ml), sowie der Anteil lebender Zellen an der Gesamtpopulation anhand dieser Stichprobe errechnet.

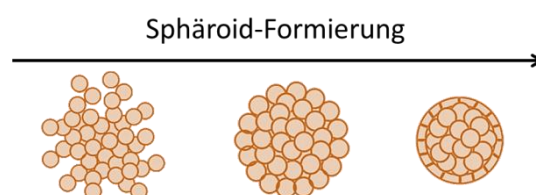
### 2.2.1.4 3D-Zellkultur

Zur Generierung von Sphäroiden wurde die sog. *hanging drop* - Methode angewandt (196). Dafür wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 20 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) isoliert voneinander und blasenfrei auf die Deckel-Innenseite einer Petrischale (Greiner Bio-One) pipettiert. Auf einem Deckel konnten maximal 40 Tropfen verteilt werden, um den nötigen Abstand sicherzustellen und ein Zusammenlaufen der Tropfen zu vermeiden. Um die Viskosität des Mediums und damit die Stabilität der Tropfen zu erhöhen, wurde dem Zellkulturmedium 0,12 % Methylzellulose (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Nach der Aussaat wurde der Deckel, wie in **Abbildung 16** dargestellt, vorsichtig gewendet und auf das Unterteil der Petrischale platziert. Die Tropfen hielten sich durch die Oberflächenspannung am Deckel.



**Abbildung 16** Generierung von Sphäroiden mittels *hanging drop* - Methode. Eine bestimmte Anzahl von Zellen wird in definiertem Volumen auf die Deckel-Innenseiten einer Petrischale platziert. Der Deckel wird gewendet. Die fehlende Möglichkeit an die Oberfläche einer Zellkulturschale zu adhären zwingt die Zellen zur Bildung eines 3D-Zellverbands.

Das Unterteil der Schale war mit 5 ml PBS (Sigma-Aldrich) gefüllt, um die Zellen während der Inkubation vor Austrocknung zu schützen. Um die Oberflächenspannung dieser Flüssigkeit zu reduzieren und eine optimale Verteilung in der Schale zu gewährleisten, wurde dem PBS (Sigma-Aldrich) ein Tropfen Tween 20 (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Zellen wurden so für 24 Stunden (Std) bis zur weiteren Verwendung im Blutschrank (Thermo Scientific) inkubiert. Die fehlende Möglichkeit zur Adhäsion an der Oberfläche einer Zellkulturschale zwingt die Zellen zur Bildung eines 3-dimensionalen-Zellverbands, wie in **Abbildung 17** schematisch dargestellt. Abhängig von den Zelleigenschaften können diese Zellverbände lockerer oder stabiler sein.



**Abbildung 17** Formung eines Sphäroids aus einem ursprünglich losen Zellverband durch Zellaggregation (197).

### **2.2.1.5 Mikroskopie**

Für mikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen in verschiedenen Zellkulturgefäßen wie T75 (Corning), 6-, 24- und 96-Well Platte (Greiner Bio-One), sowie dem Objektträger eines *4-Well Culture Slides* (BD Biosciences) in 2x, 4x, 10x, 20x oder 40x Vergrößerung digital fotografiert. Es wurde mit zwei verschiedenen Mikroskopen gearbeitet. Mit dem Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Amsterdam, NL) waren einfache Hellfeldaufnahmen möglich. Mit dem Mikroskop Eclipse TE2000-U (Nikon) konnten komplexere Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt werden. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Adsorption von 360 nm und einer Emission von 460 nm generiert. Mit der Software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon) konnten Schärfe, Kontrast und Belichtung direkt angepasst und ein Maßstab hinzugefügt werden.

## 2.2.2 Behandlung

### 2.2.2.1 Radiatio

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte durch den Linearbeschleuniger (Primus, Siemens, Nürnberg, D) der Strahlentherapie der Universitätsklinik Regensburg, unter Leitung von Oberarzt PD Dr. Matthias Hautmann.

Die Zellen wurden frühestens 24 Std nach der Aussaat bestrahlt. Zum Ort der Bestrahlung wurden die Zellen in einer geschlossenen Styroporkiste transportiert um die Kontaminationsgefahr zu minimieren und Temperaturschwankungen während des Transports so gering wie möglich zu halten. Bestrahlt wurde bei Raumtemperatur (RT). Für die Bestrahlung wurden die Zellkulturschalen direkt auf der Behandlungsliege platziert. Um Aufbaueffekte zu kompensieren, wurden 2 Zentimeter (cm) dicke Plexiglasplatten über und unter den Zellkulturflaschen positioniert. Die externe Bestrahlung erfolgte über ein vorderes Portal eines 6-MV-Linearbeschleunigers, durch einen Photonenstrahl (3 Gy/Min) (198). Bei allen Bestrahlungsexperimenten dienten nicht-bestrahlte Zellen als Kontrolle. Diese wurden, abgesehen von der Bestrahlung, wie bestrahlte Zellen behandelt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde das Kulturmedium in allen Schalen durch frisches Medium ersetzt. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels wurde als Experimentstartzeitpunkt definiert. **Abbildung 18** zeigt den verwendeten Linearbeschleuniger der Universitätsklinik Regensburg. Auf der Behandlungsliege ist die untere Plexiglasplatte mit einer Zellkulturflasche darauf zu sehen.



**Abbildung 18** 6-MV-Linearbeschleuniger der Strahlentherapie der Universitätsklinik Regensburg.

### 2.2.2.2 *Transiente PD-L1 siRNA-Transfektion*

Um die PD-L1-Proteinexpression zu senken wurden die Zellen mit *small interfering RNA* (siRNA) transfiziert. Hierbei handelte es sich um eine transiente Transfektion. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion, bei der das Ziel-Gen dauerhaft in das Genom integriert wird, hält die transiente Transfektion nur für einen bestimmten Zeitraum an. Dieser ist davon abhängig wie oft sich die Zelle teilt, hält aber bei den untersuchten Zelllinien mindestens für den experimentellen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen an. Eine erfolgreiche Transfektion wurde für jedes Transfektions-Experiment mittels Western Blot (WB)-Analyse nachgewiesen. Für einen schonenden und effizienten siRNA-Knockdown (KD) wurden siRNA-Pools, bestehend aus vier spezifischen Zielsequenzen, verwendet. Um die durch die Transfektion bedingten *off-target* Effekte zu normalisieren, wurde ein Kontrollansatz mit *non-targeting* (NT) siRNA durchgeführt. Diese NT siRNA bestand aus einem siRNA-Pool von vier Sequenzen, die keine bekannten Gene im Zielorganismus ansteuerten. Nachfolgend wird eine Übersicht der eingesetzten siRNA-Sequenzen (Dharmafect, Horizon, Cambridge UK) gezeigt.

PD-L1-Kockdown: siGENOME Human CD274 siRNA- SMARTpool (M-015836-01-0005):

- (1) UGAAAGGACUCACUUGGUA (D-015836-01),
- (2) CAUAGUAGCUACAGACAGA (D-015836-02),
- (3) AGACCUGGCUGCACUAAUU (D-015836-03),
- (4) GGACCUAUAUGUGGUAGAG (D-015836-04).

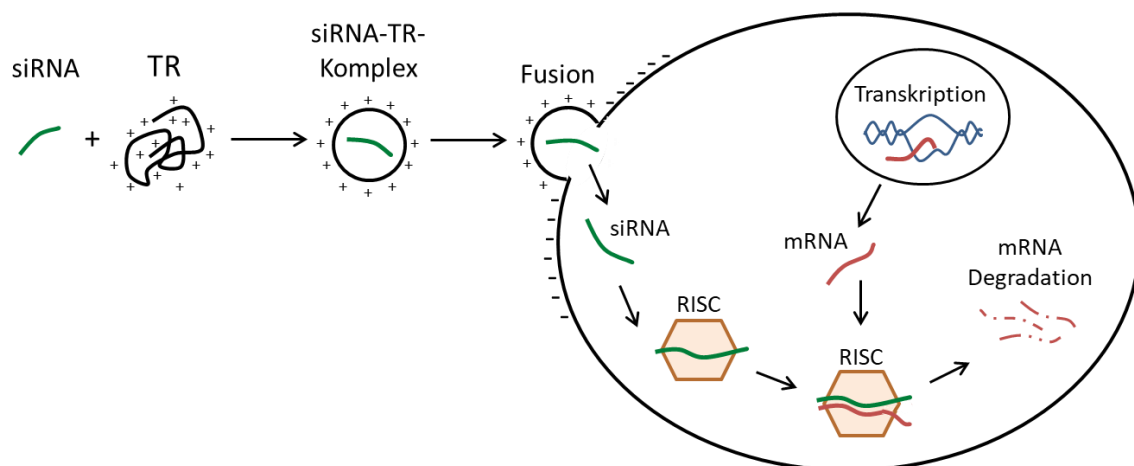
Non-Targeting siRNA: ON-TARGETplus Non-Targeting Pool (D-001810-10-20):

- (1) UGGUUUACAUGUCGACUAA,
- (2) UGGUUUACAUGUUGUGUGA,
- (3) UGGUUUACAUGUUUUCUGA,
- (4) UGGUUUACAUGUUUCCUA.

Die verwendete siRNA wurde lyophilisiert geliefert. Diese wurde mit sterilem RNase- und DNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich) rekonstituiert und auf eine Konzentration von 20 Mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) verdünnt und aliquotiert. SiRNA wurde bei -20 Grad Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) bis zur Verwendung gelagert. Die Transfektion erfolgte in einer 6-Well Platte (Greiner Bio-One) mit Zellen, die sich nach dem Lösen vom Boden der Zellkulturflasche noch in Suspension befanden. Als Transfektions-Reagenz (TR) diente Dharmafect-1 (Horizon). 4  $\mu\text{l}$  TR wurden zunächst im Verhältnis 1:50 mit serumfreien (sf) Medium auf 200  $\mu\text{l}$  verdünnt und dann für

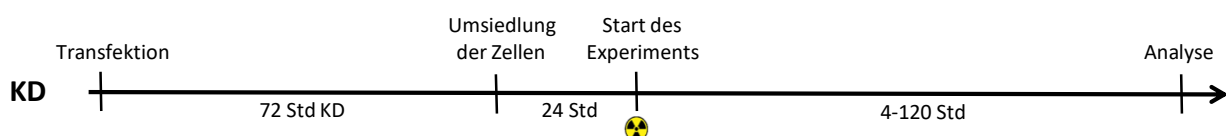


10 Min bei RT inkubiert. Diese 200 µl wurden im Anschluss mit weiteren 400 µl sf-Medium auf 600 µl aufgefüllt. Gemäß Herstellerprotokoll wurden 25 nM siRNA für eine Transfektion eingesetzt. Dafür wurden 2,5 µl der siRNA-Stocklösung mit sterilem Wasser (Sigma-Aldrich) auf 200 µl verdünnt, mit dem TR gemischt (800 µl gesamt) und für weitere 30 Min inkubiert, um siRNA-TR-Komplexe zu bilden. Im letzten Schritt wurden, abhängig von der Zelllinie,  $1,5 \times 10^5$  -  $3 \times 10^5$  Zellen in Suspension, in 1,2 ml P/S-freiem Medium zu den siRNA-TR-Komplexen gegeben (2 ml gesamt). **Abbildung 19** zeigt das Prinzip der siRNA Transfektion.



**Abbildung 19** Schematische Darstellung der siRNA Transfektion. RNA ist ein hydrophiles Molekül, das die hydrophobe Zellmembran unter normalen Umständen nicht passieren kann. Das Transfektionsreagenz bildet zusammen mit der 20-25 Basenpaar langen siRNA einen positiv-geladenen Komplex, der eine Fusion mit der Zellmembran erlaubt und somit das Einbringen von fremd-RNA in die Zelle ermöglicht. In der Zelle inhibieren siRNA-Moleküle posttranskriptional die RNA-Expression, durch Bindung an die mRNA, in einem *RNA-induced silencing complex* (RISC), mit anschließender Degradation der mRNA.

Die Transfektions-Dauer betrug 72 Std. Nach dieser Zeit wurden die Zellen aus der 6-Well Platte (Greiner Bio-One) gelöst und in entsprechender Zellzahl in die zum geplanten Experiment passenden Kulturschalen ausgesät. 24 Std nach Aussaat konnte mit einer weiteren Behandlung der Zellen begonnen werden. Der Behandlungszeitpunkt wurde als Experimentstart (0 Std) definiert. Die in **Abbildung 20** dargestellte Zeitachse zeigt den zeitlichen Verlauf eines Experiments, bei dem Zellen mit siRNA behandelt wurden.



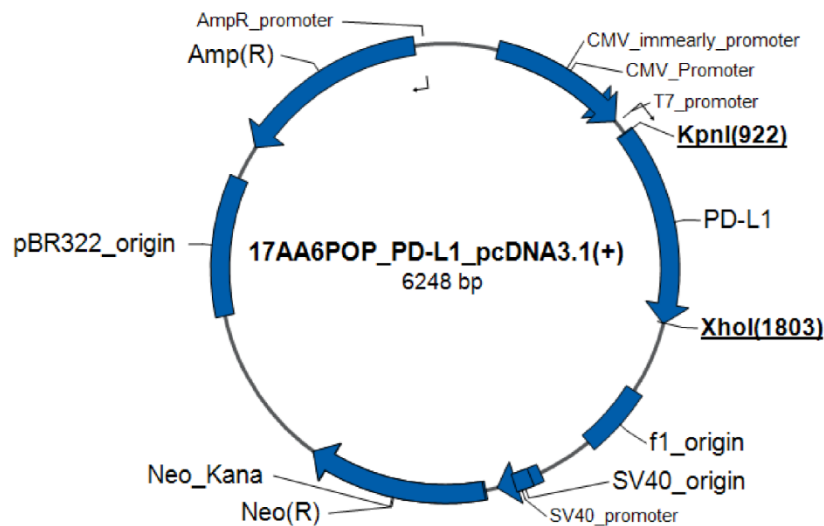
**Abbildung 20** Zeitachse zum Ablauf der siRNA Transfektion vom Beginn der Transfektion, bis zum Experimentstart und der Analyse der Zellen.

### 2.2.2.3 Transiente PD-L1 Plasmid-Transfektion

Um die PD-L1-Proteinexpression zu erhöhen wurden die Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert. Hierbei handelte es sich ebenfalls um eine transiente Transfektion. Die PD-L1-Proteinexpression konnte in den verwendeten Zelllinien für den gesamten experimentellen Beobachtungszeitraum von maximal fünf Tagen, signifikant erhöht werden.

Das verwendete PD-L1 Plasmid PD-L1 pcDNA 3.1 (+) (Thermo Scientific) ist 6248 Basenpaare lang und wurde in *E.coli* K12 DH10B™ T1R kloniert. **Abbildung 21** zeigt die schematische Plasmidkarte von PD-L1 pcDNA 3.1 (+).

#### Plasmid Map:

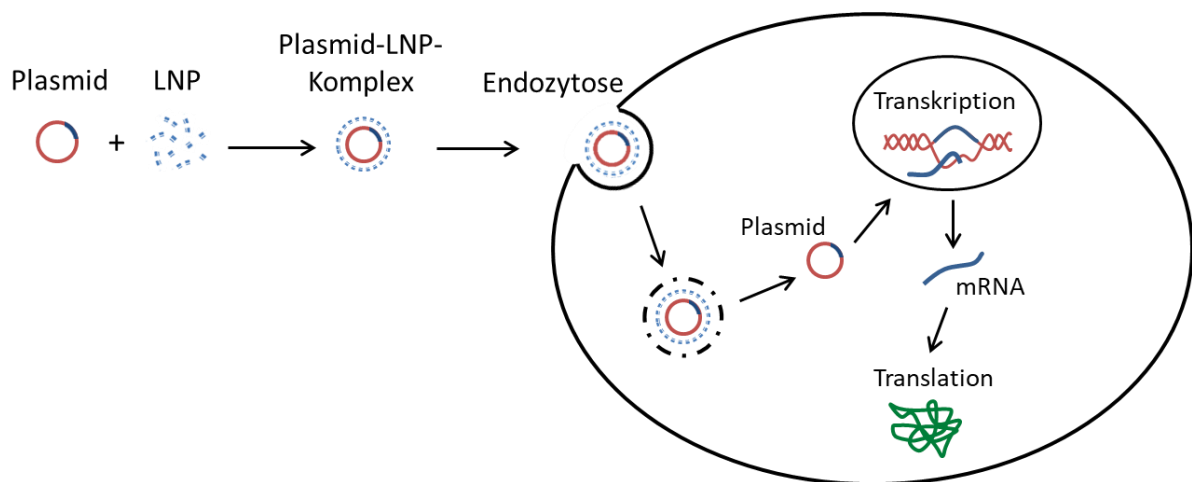


**Abbildung 21** Schematische Plasmidkarte von PD-L1 pcDNA 3.1 (+). Eingezeichnet sind, unter anderem, die Gene für Ampicillin-Resistenz Amp(R) und Kanamycin-Resistenz Neo(R), sowie der Replikationsursprung und die Restriktionsschnittstellen KpnI(922) und XhoI(1803).

Um *off-target* Effekte, bedingt durch die Transfektion, zu normalisieren, wurde als Kontrolle der Leervektor (engl.: *control vector*, CV) CV pcDNA 3.1 (+) (Thermo Scientific) eingesetzt. Dieser besaß die gleiche Größe, allerdings ohne kodierende Gensequenz.

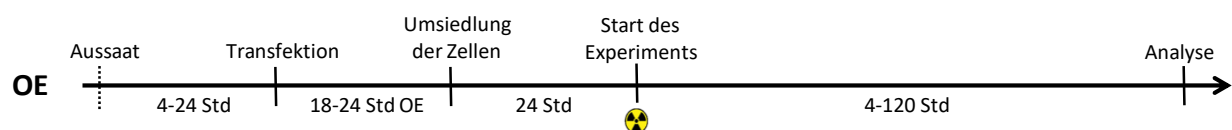
Die Transfektion erfolgte in einer 6-Well Platte (Greiner Bio-One) an bereits adhären, subkonfluenten Zellen. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  -  $2,5 \times 10^5$  Zellen 4 - 24 Std vor der Transfektion ausgesät. Die Zellen wurden mit FuGENE HD - Transfektions-Reagenz (TR) (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben transfiziert. TR und pcDNA wurden im Verhältnis 5:2 gemischt. Das heißt pro Well 5 µl TR auf 2 µg pcDNA eingesetzt, in einem Endvolumen von 100 µl, das mit DMEM (PAN-Biotech) erreicht wurde. Die

Reaktionskomplexe inkubierten 10-15 Min bei RT. Bevor die Reaktionskomplexe zu den Zellen in das Kulturmedium pipettiert wurden, wurde dieses durch 2 ml DMEM (PAN-Biotech), mit 1 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich), ohne Antibiotika ersetzt. **Abbildung 22** zeigt schematisch das Prinzip der PD-L1-Überexpression (engl.: *overexpression*, OE), durch Plasmid-Transfektion.



**Abbildung 22** Schematische Darstellung der Plasmid-Transfektion. Bei FuGENE handelt es sich um ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz. Es besteht aus Polymeren, die in der Lage sind mit DNA Komplexe zu bilden, die in wässrigen Lösungen Mizellen formen (199,200). Diese Mizellen ermöglichen die Endozytose des Plasmids in die Zelle. Im Zellkern wird die pcDNA transkribiert. Im Zytoplasma erfolgt Translation der mRNA, wodurch die Expression des Ziel-Proteins gesteigert wird.

Transfiziert wurde für 18-24 Std. Nach der Transfektion wurden die Zellen aus der 6-Well Platte gelöst und in entsprechender Zellzahl, in die zum geplanten Experiment passenden Kulturschalen ausgesät. 24 Std nach dieser Überführung konnte eine weitere Behandlung, wie beispielsweise die Bestrahlung der Zellen, vorgenommen werden. Dieser Behandlungszeitpunkt wurde auch hier als Experimentstart (0 Std) definiert. Ob die Transfektion erfolgreich war wurde für jedes einzelne Transfektions-Experiment mittels WB-Analyse überprüft. Die in **Abbildung 23** dargestellte Zeitachse zeigt den zeitlichen Ablauf eines Experiments bei dem Zellen mit Plasmid DNA überexprimiert wurden.



**Abbildung 23** Zeitachse zum Ablauf der Plasmid OE vom Beginn der Transfektion, bis zum Experimentstart und der Analyse der Zellen.

#### **2.2.2.4 Inhibition von GSK-3 $\beta$ mit BIO**

Für die Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3 $\beta$  Inhibition wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in eine 6-Well Platte (Greiner Bio-One) überführt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 70 % - 80 % entweder mit 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M des spezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitors (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim (BIO) (Sigma-Aldrich), mit 20 mM des unspezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitors Lithiumchlorid (LiCl) (Sigma-Aldrich) oder mit 0,05 % des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich) behandelt. Bei BIO handelte es sich um ein zellgängiges Peptid, das für GSK-3 $\beta$  als kompetitives Substrat wirkt und somit die GSK-3 $\beta$ -Aktivität inhibiert. LiCl beeinflusste nicht ausschließlich die GSK-3 $\beta$ -Aktivität (201). Bei der Inkubation mit DMSO handelte es sich um eine Kontrolle um auszuschließen, dass Effekte allein aufgrund der Inkubation mit dem Lösungsmittel beobachtet werden. Nach 24 Std Inkubationszeit wurden die Zellen für eine WB-Analyse geerntet, um die PD-L1-Proteinexpression in Abhängigkeit von der GSK-3 $\beta$  Inhibition, zu bestimmen.

#### **2.2.2.5 Inhibition von PI3K mit Buparlisib**

Zur selektiven Inhibition der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) und der damit einhergehenden Hemmung der Proliferation, wurde der Inhibitor Buparlisib (BKM120, NVP-BKM120) (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA) verwendet. Aus 5 (Milligramm) mg des lyophilisierten Inhibitors wurde mit DMSO eine 50 (Millimolare) mM Stammlösung hergestellt, die aliquotiert bei -20°C gelagert wurde. Mit der Behandlung der Zellen durch Buparlisib wurde frühestens 24 Std nach der Aussaat begonnen. Benötigte Verdünnungen wurden erst unmittelbar vor der Verwendung, mit Antibiotika-freiem Kulturmedium, hergestellt. Die eingesetzten Buparlisib-Konzentrationen lagen in einem Bereich von 10 (Nanomolar) nM bis 10  $\mu$ M, abhängig von der behandelten Zelllinie. Als Kontrolle diente für die Experimente antibiotikafreies Medium mit Lösungsmittel DMSO, entsprechend der DMSO-Konzentration in der höchsten Buparlisib-Dosis. Es wurde Wert darauf gelegt, für jede Zelllinie die Konzentration zu finden, die es bei minimaler Toxizität ermöglicht, die Proliferation zu hemmen. Daher wurden mittels MTT-Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) für jede Zelllinie die individuelle inhibitorische Konzentration (engl.: *inhibitory concentration*, IC) von Buparlisib ermittelt, bei der 50 % (IC<sub>50</sub>) oder 75 % (IC<sub>75</sub>) der Zellen die Proliferation einstellten.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Genexpression

#### 2.2.3.1.1 RNA-Isolierung

Für die Gewinnung von RNA wurden die Zellen in 6-Well Platten (Greiner Bio-One) kultiviert. Vor der Ernte wurden die Zellen mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen. Die RNA-Isolation aus den Zellen erfolgte durch das RNeasy-Mini Kit (Qiagen, Hilden, D). Um die Lyse der Zellen durch den im Kit enthaltenen Lyse-Puffer zu unterstützen, wurde das Lysat mit einer Omnifix® 100 Solo 1,0 ml Spritze (B. Braun Melsungen, D) 15-20 mal durch eine Microlance 3 20 G Kanüle (BD Bioscienc, Franklin Lakes, NJ, USA) gezogen. Im Anschluss wurde die RNA laut Herstellerprotokoll, über die im Kit enthaltene Säule isoliert und aufgereinigt. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich) von der Säule eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### 2.2.3.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Pro Messung wurden 2 µl der eluierten RNA verwendet und die RNA-Konzentration in ng/µl, sowie die Absorption bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei diesen Wellenlängen ließen sich Rückschlüsse auf die Reinheit der isolierten RNA ziehen. Für eine optimale Reinheit sind die Richtwerte aus **Tabelle 10** zu entnehmen.

**Tabelle 10** Ermittlung der RNA-Reinheit durch Absorptionswerte bei 230, 260 und 280 nm

Absorption bei	Optimaler Wert*	niedrigere Werte*
260 nm/280 nm	2,0	Verunreinigung mit Proteinen, Phenol
260 nm/230 nm	1,8 bis 2,2	Kontaminationen mit Phenol, TRIzol

\* entnommen aus NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer - User Manual (202)

### 2.2.3.1.3 Reverse Transkription

Die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (engl.: *complementary DNA*, cDNA) wurde mit dem *Transkriptor First Strand* cDNA Synthesekit (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die reverse Transkription von 1 µg RNA erfolgte mit Oligo-(dT)<sub>18</sub>-Primern und Random Hexamer Primern (**Tabelle 11**).

Diese wurden für 10 Min bei 65°C denaturiert (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, D) und anschließend auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe des Reaktionsmixes, welcher u.a. Nukleotide und reverse Tanskriptase enthielt (**Tabelle 12**), wurde die RNA für 30 Min bei 55°C transkribiert (T3000 Thermocycler, Biometra). Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. **Tabelle 13** zeigt das für die Transkription verwendete Programm.

### 2.2.3.1.4 RT-qPCR

Die Genexpression wurde mittels Real-Time oder quantitativer PCR (qPCR) ermittelt. Dafür wurden 3 µl cDNA, im Verhältnis 1:2 mit RNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich) verdünnt, mit 17 µl des Brilliant III ultra fast quantitative polymerase chain reaction Mastermixes (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Zielgen-spezifischen Real-Time PCR-Primern (TIB Molbiol, Berlin, D) und TaqMan UPL-Sonde Nr. 48 (Roche) in eine Quali-PCR-Platte (96 Wells, Kisker Biotech, Steinfurt, D) gegeben (**Tabelle 15**). Als Negativ-Kontrolle wurde 3 µl RNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich), anstatt cDNA, verwendet. Zur Normalisierung wurde von jeder Probe der 18S-Messenger-RNA (mRNA)-Gehalt bestimmt. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate erstellt. **Tabelle 14** zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

Die 96-Well-Platte wurde mit einem transparenten BZO Seal Film (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D) abgeklebt und vor dem Start in der Zentrifuge Heraeus® Multifuge® 3S-R (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, D) für einige Sekunden zentrifugiert. Die qPCR wurde mit dem Gerät Stratagene MX3005Pro (Agilent Technologies) durchgeführt.

Das verwendete Programm ist aus **Tabelle 16** zu entnehmen.

Die Auswertung der Daten erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode (203) mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

**Tabelle 11** Denaturierungspuffer für die reverse Transkription

Komponente	Menge
RNA	1,0 µg
Oligo-(dT)18-Primer [50 µM]	1,0 µl
Random Hexamer Primer [600 µM]	2,0 µl
Wasser, PCR-grade	0-9 µl
<b>gesamt</b>	<b>13,0 µl</b>

**Tabelle 12** Transkriptionspuffer für die reverse Transkription

Komponente	Menge
RT Buffer, 5x	4,0 µl
Protector RNase Inhibitor [40 U/µl]	0,5 µl
dNTPs [je 10 mM]	2,0 µl
Transcriptor R Transcriptase [20 U/µl]	0,5 µl
<b>gesamt</b>	<b>7,0 µl</b>

**Tabelle 13** Programm zur Durchführung der reversen Transkription

Programm RT	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	25°C	10 min
	55°C	30 min
Inaktivierung des Enzyms	85°C	5 min
	4°C	Pause

**Tabelle 14** Primer der qPCR

Ziel-Gen	Name	Primer-Sequence (5'-3')	UPL-Probe
18S	P208 for	GCAATTATTCCCATGAACG	#48
	P208 rev	GGGACTTAATCAACGCAAGC	#48
PD-L1 / CD274	P213 for	CTACTGGCATTGCTGAACG	#48
	P213 rev	TGCAGCCAGGTCTAATTGTTT	#48

**Tabelle 15** Reagenzien der qPCR

Komponente	Menge
cDNA / H <sub>2</sub> O	3,0 µl
2x Brilliant III QPCR MasterMix	10,0 µl
Primer forward [20 µM]	0,5 µl
Primer reverse [20 µM]	0,5 µl
UPL-Sonde [10 µM]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O, PCR-grade	2,5 µl
<b>gesamt</b>	<b>17,0 µl</b>

**Tabelle 16** Programm zur Durchführung der qPCR

Programm qPCR	Temperatur	Dauer
Vorinkubation	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	12 Sek
Primer-Hybridisierung	60°C	45 Sek
Elongation	72°C	10 Sek

} 60 Zyklen



### 2.2.3.1.5 RT<sup>2</sup> Profile PCR-Array

Für die Genexpressions-Analyse mit dem RT<sup>2</sup> Profile PCR-Array (Qiagen) wurde RNA aus Sphäroiden isoliert. Die RNA wurde mit dem RNeasy-Minikit (Qiagen), wie in **Abschnitt 2.2.3.1.1** beschrieben, isoliert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde speziell für die Durchführung des RT<sup>2</sup> Profile PCR-Arrays, während der RNA Isolation ein zusätzlicher Verdau der genomischen DNA mit RNase-freier DNase (Qiagen) durchgeführt. Nach der Bindung der RNA an die Säule und dem ersten Waschschrift zur Entfernung von Verunreinigungen wurden 80 µl DNase-Reagenz auf die Säule gegeben und für 15 Min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Protokoll der RNA Isolierung nach Herstellerangaben bis zur Elution durchgeführt. Das DNase Reagenz wurde unmittelbar vor der Verwendung aus 10 µl der DNase Stocklösung und 70 µl des mitgelieferten DNase Puffers hergestellt.

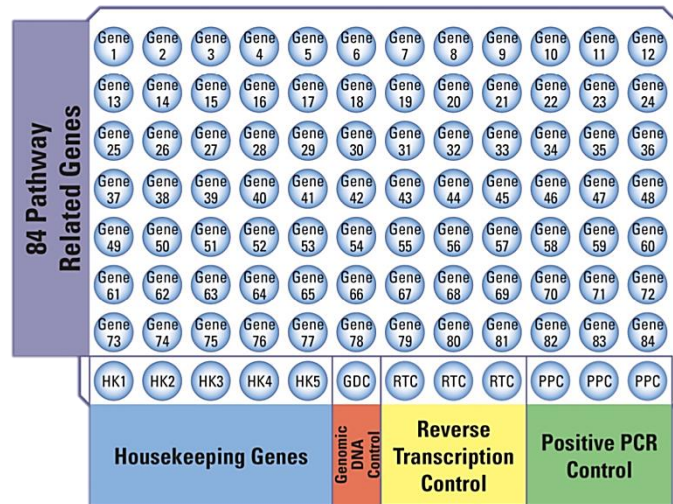
Der Array erfolgte in einer 96-Well Platte (Qiagen). Pro Well sollte 25 ng cDNA eingesetzt werden. Daher wurden für die Durchführung eines Arrays, je nach Verfügbarkeit 2700-3000 ng RNA in cDNA transkribiert. Die reverse Transkription erfolgte mit dem *Transkriptor First Strand* cDNA-Synthesekit (Roche), wie in **Abschnitt 2.2.3.1.5** beschrieben. Da für eine optimale Transkription der Transkriptionsansatz auf 1000 ng RNA beschränkt ist, wurden für die benötigte Menge cDNA mindestens drei separat durchgeführte Ansätze miteinander gepoolt.

Wie in **Tabelle 17** aufgelistet, wurde für die Durchführung eines Arrays ein Reaktionsmix aus 2500 ng cDNA und 1275 µl RT<sup>2</sup> Real-Time SYBR Green/Rox PCR-Mastermix (Qiagen), für 102 Wells hergestellt und dieser mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 2550 µl aufgefüllt. Von diesem Reaktionsmix wurden pro Well 25 µl eingesetzt, was 25 ng cDNA pro Well entsprach.

**Tabelle 17** qPCR Array Reaktionsmix aus cDNA und RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix für 102 Wells

Reagenz	Menge
RT <sup>2</sup> Real-Time SYBR Green/Rox PCR-Mastermix	1275 µl
2550 ng cDNA und ddH <sub>2</sub> O	1275 µl
<b>gesamt</b>	<b>2550 µl</b>

**Abbildung 24** zeigt das allgemeine Platten-Layout eines RT<sup>2</sup> Profile PCR-Arrays (Qiagen) und das spezifische Layout des Human Cell Motility RT<sup>2</sup> Profile PCR-Arrays. Die 96-Well-Platte setzt sich zusammen aus 84 migrations-relevanten Genen und 12 Kontrollen. Die Amplifikation erfolgte, wie aus **Tabelle 18** zu entnehmen, in 40 Zyklen bei 60°C für je 1 Min. Als Qualitätskontrolle diente eine Dissoziationskurve. Die Analyse wurde mit einem Online zur Verfügung gestellten Programm von Qiagen (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr> (2020)) durchgeführt.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACTN1	ACTN3	ACTN4	ACTR2	ACTR3	AKT1	ARF6	ARHGDI1	ARHGGEF7	BAIAP2	BCAR1	CAPN1
B	CAPN2	CAV1	CDC42	CFL1	CRK	CSF1	CTTN	DIAPH1	DPP4	EGF	EGFR	ENAH
C	EZR	FAP	FGF2	HGF	IGF1	IGF1R	ILK	ITGA4	ITGB1	ITGB2	ITGB3	LIMK1
D	MAPK1	MET	MMP14	MMP2	MMP9	MSN	MYH10	MYH9	MYL9	MYLK	PAK1	PAK4
E	PFN1	PIK3CA	PLAUR	PLCG1	PLD1	PRKCA	PTEN	PTK2	PTK2B	PTPN1	PXN	RAC1
F	RAC2	RASA1	RDX	RHO	RHOA	RHOB	RHOC	RND3	ROCK1	SH3PXD2A	SRC	STAT3
G	SVIL	TGFB1	TIMP2	TLN1	VASP	VCL	VEGFA	VIM	WASF1	WASF2	WASL	WIPF1
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Abbildung 24** Allgemeines und spezifisches Platten-Layout des Human Cell Motility RT<sup>2</sup> Profile PCR-Arrays (204).

**Tabelle 18** Programm zur Durchführung des RT<sup>2</sup> Profile PCR-Arrays

Programm qPCR	Temperatur	Dauer
Vorinkubation	95°C	10 Min
Denaturierung	95°C	15 Sek
Primer-Hybridisierung und Elongation	60°C	60 Sek
Dissoziationskurve	65-95°C	2°C/Min

} 40 Zyklen

### 2.2.3.2 Proteinexpression

#### 2.2.3.2.1 Herstellung von Protein-Lysaten

Um die Proteinexpression der Zellen in 2D- und 3D-Zellkultur zu analysieren wurden Zell-Lysate hergestellt. Für die Ernte von adhärenenten Zellen wurden die Zellen zunächst mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und der Überstand verworfen. Die Ernte erfolgte auf Eis. Als Lyse-Puffer diente der Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA) (Sigma-Aldrich), mit Protease-Inhibitoren (cOmplete, mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Dieser Puffer wurde direkt auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D) wurden die Zellen mechanisch von der Kulturschale gekratzt und in ein Eppendorf Tube (Eppendorf AG, Hamburg, D) überführt. Das Rezept für den Lyse-Puffer ist aus **Tabelle 19** zu entnehmen. Der frisch hergestellte Puffer wurde aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und nur gekühlt verwendet Puffer, um die Enzymaktivität vorhandener Proteinasen im Lysat zu erniedrigen.

**Tabelle 19** RIPA-Lysepuffer

Komponente	Menge
RIPA Puffer	10 ml
Proteinase-Inhibitor	1 Tablette

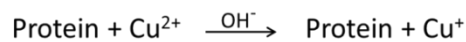
Sphäroide wurden zunächst in ein gekühltes 1,5 oder 2,0 ml Tube (Eppendorf AG) überführt. Um diese nicht durch Scherkräfte bereits bei der Ernte zu zerreißen und damit ggf. die Ausbeute zu verringern, wurde zum Aufsammeln das vorderste Stück einer 100  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze (Greiner Bio-One) abgeschnitten. Durch diese vergrößerte Öffnung konnten die Sphäroide leichter aufgesaugt werden. Sphäroide der gleichen Behandlung wurden gepoolt. Durch kurze Zentrifugation sedimentierten die Sphäroide auf den Boden des Tubes. So konnte der Überstand verworfen und die Sphäroide vor der Lyse einmal mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen werden.

Durch Ultraschallbehandlung (Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls, Berlin, D) wurde die Lyse jeder Probe mit 50 % Intensität für insgesamt 20 Sekunden, in Intervallen von je 1 Sekunde, unterstützt. Im Anschluss wurden nicht lysierbare Zellbestandteile durch Zentrifugation vom Überstand mit den darin enthaltenen gelösten Proteinen für 10 Min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 Umdrehungen pro Minute (rpm) getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt, das Pellet wurde verworfen. Die Überstände wurden bis zur Verwendung ununterbrochen gekühlt und für die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

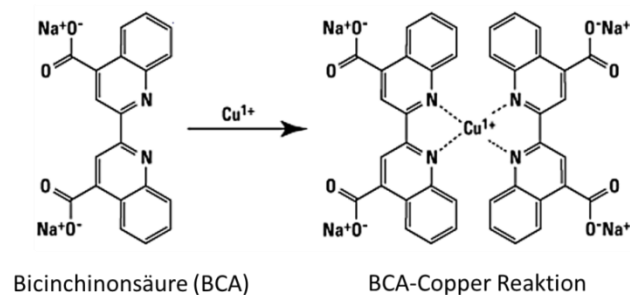
### 2.2.3.2.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration wurde mittels Bicinchinonsäure (BCA)-Assay (Merck, Darmstadt, D) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um einen zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Abhängigkeit der Protein-Konzentration zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die dann im zweiten Schritt mit je zwei BCA-Molekülen einen violetten Komplex bilden, der photometrisch mit Hilfe eines Multiplattenlesers gemessen werden kann. Diese Reaktion wird in **Abbildung 25** veranschaulicht.

**1. Schritt:** Biuret-Reaktion



**2. Schritt:**



**Abbildung 25** Nachweisreaktionen des BCA-Assays.

Der BCA-Assay wurde in einer 96-Well Platte (Greiner Bio-One) durchgeführt. Durch die Verwendung eines Protein-Standards bekannter Konzentration konnte die absolute Protein-Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  berechnet werden. Der Protein-Standard aus Bovinem Serum Albumin (BSA) (Thermo Scientific) wurde in Triplikaten von je  $10 \mu\text{l}$  eingesetzt. Er umfasste die Konzentrationen 0 (ausschließlich RIPA-Puffer), 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000 und  $1500 \mu\text{g}$  BSA in RIPA-Lyse-Puffer. Vom Protein-Lysat wurde i.d.R. eine Verdünnung im Verhältnis 1:5, also  $2 \mu\text{l}$  eingesetzt. Abhängig von der Verfügbarkeit, wurden vom Protein-Lysat mindestens zwei Replikate gemessen. Standard und Protein wurden vorgelegt, danach wurde  $200 \mu\text{l}$  BCA-Reagenz im Mischverhältnis 1:50 von BCA-Substrat und Puffer (in BCA Kit enthalten) zugegeben und die Platte für maximal 30 Min im Brutschrank (HERAcell 240, Thermo Scientific), bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert bis ein sichtbarer Farbumschlag erkennbar war. Vor der Messung wurde die Reaktion durch kurzes Abkühlen, von etwa 2 Min bei  $4^\circ\text{C}$ , verlangsamt. Die Absorption wurde bei RT und 595 (Nanometer) nm mithilfe des GENios Plattenphotometers (GENios, Tecan Group, Männedorf, CH), unter der Verwendung des Programms Magellan 6 (Tecan Group) bestimmt.

### 2.2.3.2.3 Western Blot

#### 2.2.3.2.3.1 Acrylamidgel

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele mit 1,5 (Millimeter) mm Dicke und 15 Proben-Taschen hergestellt. Für die Herstellung wurde das *Hand Casting System* von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) genutzt. Die Gele bestanden aus zwei Schichten: einem 4 %-Acrylamid-Sammelgel und einem 10 %-Acrylamid-Trenngel. **Tabelle 20 und 21** zeigen die Zusammensetzung der Gele.

**Tabelle 20** 10 %-Acrylamid-Trenngel

Komponente	Menge
Entionisiertes H <sub>2</sub> O	2,7 ml
Acrylamid, 40 %	1,875 ml
SDS, 20 %	37,5 µl
1 M Tris pH 8,8	2,825 ml
APS, 10 %	37,5 µl
TEMED	7,5 µl

**Tabelle 21** 4 %-Acrylamid-Sammelgel

Komponente	Menge
Entionisiertes H <sub>2</sub> O	4,35 ml
Acrylamid, 40 %	562 µl
SDS, 20 %	28,5 µl
1 M Tris pH 6,8	675 µl
APS, 10 %	37,5 µl
TEMED	6 µl

#### 2.2.3.2.3.2 SDS-PAGE

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden 30 µg oder 50 µg Protein bei 70°C für 10 Min in SDS-haltigem Lämmli-Puffer (**Tabelle 24**) mit 1 % β-Mercaptoethanol (Merck) denaturiert. Dieser Puffer ermöglichte neben der Sichtbarmachung der Probe durch die Blaufärbung von Bromphenolblau (Sigma-Aldrich) und dem Beschweren der Probe im SDS-PAGE-Puffer (**Tabelle 26**) auch die gleichmäßige Benetzung der denaturierten Proteine mit negativ-geladenem SDS und somit eine ladungsunabhängige Auftrennung der Proteine. Unter Verwendung eines 10 % Trenngels wurden die Proben, für 20 Min bei 70 Volt (V) und für ca. 60 Min bei 140 V, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Proteinstandard *Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) ermöglichte eine Molekulargewichtsanalyse der aufgetrennten Proteine.

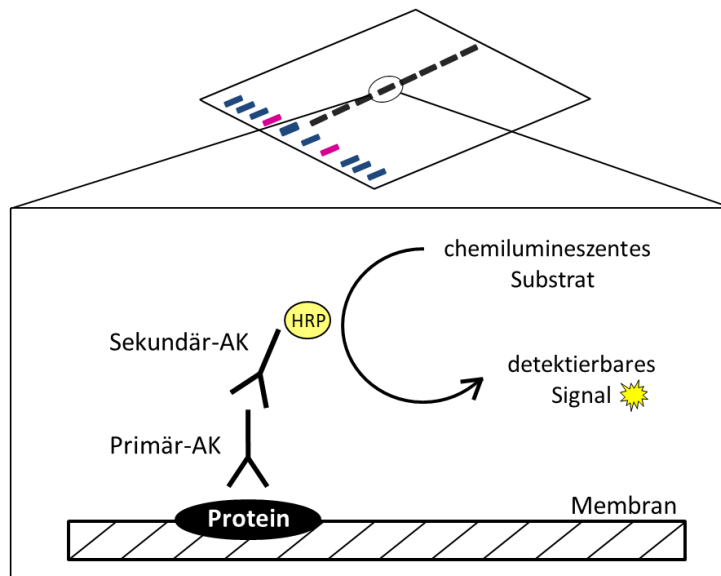
### 2.2.3.2.3.3 Blotting

Im sog. Blotting-Puffer wurden die Proteine, unter Kühlung, für etwa 80 Min bei 140 Milliampere (mA) vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (Roche).

Vor der Inkubation mit einen spezifischen Primär-Antikörper (AK) wurden unspezifische Bindungen auf Membranstellen, die nicht mit Proteinen besetzt waren, blockiert. Dafür wurde mit 3 % BSA (Biomol) oder 5 % Magermilch (Carl Roth, Karlsruhe, D) in TBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) (**Tabelle 30**) verwendet und für 1 Std bei RT inkubiert. Der Primär-AK inkubierte im korrespondierenden Puffer bei 4°C über Nacht, unter ständiger Bewegung (Wippschüttler Typ MR-1 Mini, BioSan, Riga, LVA). Durch dreimaliges Waschen mit TBST (Sigma-Aldrich) wurde ungebundener Primär-AK entfernt und es folgte die Inkubation des Sekundär-AK für 1 Std bei RT. Um eine Signaldetektion zu ermöglichen waren die Sekundär-AK mit Meerrettichperoxidase (engl.: *horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert. Dieses Enzym ist in der Lage in einer chemilumineszenten Reaktion bei der Umwandlung eines Substrats Licht emittieren:

Als Substrat wurde Roti Lumin (Roth) oder Supersignal WestFemto (Thermo Scientific) verwendet. Kolorimetrische und chemilumineszente Bilder wurden mit dem hochauflösenden, hochempfindlichen ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad) verarbeitet. Als Ladekontrolle wurde ein Housekeeping Protein auf derselben Membran inkubiert oder eine Ponceau S - Färbung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D) zur Ermittlung des Gesamtproteins durchgeführt. Die zuvor gebundenen AK wurden mit *ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution* (Merck), nach Herstellerangaben, von der Membran gelöst. Die Membran wurde mit der Image Lab Software 5.2.1 (Bio-Rad) analysiert.

**Abbildung 26** zeigt das Prinzip der Detektion des Ziel-Proteins nach dem Western Blotting.



**Abbildung 26** Prinzip der WB-Analyse. Alle sich im Protein-Lysat befindlichen Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Zunächst bindet ein Primär-AK mit spezifischem Epitop an das gewünschte Ziel-Protein. Nachfolgend bindet ein Sekundär-AK, mit HRP-Konjugat, an das Primär-AK-Grundgerüst, das sich je nach Wirt unterscheidet. Im Anschluss wird die Membran mit einem chemilumineszenten Substrat inkubiert. Dieses Substrat wird durch das Enzym HRP in ein detektierbares Signal umgewandelt. Die Signalstärke korreliert mit der Menge des vorhandenen Ziel-Proteins und kann mit einer speziellen Software quantifiziert werden.

#### 2.2.3.2.3.4 Ponceau S-Färbung

Für eine korrekte Interpretation der detektierten Banden auf der Membran ist die Beladung der Geltaschen mit derselben Proteinmenge jeder Probe anzustreben. Da kleinere Abweichungen kaum vermeidbar sind wird neben der Detektion des Ziel-Proteins auch eine Ladekontrolle durchgeführt. Ungleiche Beladung kann so rechnerisch normalisiert werden und ist Voraussetzung einer korrekten Quantifizierung eines Ziel-Proteins.

Die Färbung mit Ponceau S (Serva) stellt mit der Ermittlung des Gesamtproteins eine Alternative oder eine zusätzliche Möglichkeit zur Ermittlung der Expression eines Housekeepers dar. Im Idealfall wird die Ponceau S-Färbung unmittelbar nach dem Blotting durchgeführt. Die Membran wurde für 2-5 Min bei RT inkubiert, bis eine deutliche Rotfärbung der Proteine auf der Membran sichtbar war. Die unspezifische Rotfärbung von mit Protein besetzten Stellen der Membran konnte durch wiederholtes Waschen mit ention. Wasser entfernt werden. Die Ermittlung des Gesamtproteingehalts erfolgte durch Erstellen eines kolorimetrischen Bildes mit dem ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad). Die Rotfärbung ist durch Waschen mit TBST reversibel und hat keinen bzw. sogar einen begünstigenden Einfluss auf die anschließende AK-Inkubation.

Für die WB-Analyse verwendete Antikörper:

**Tabelle 22** Für die WB-Analyse verwendete Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	c (Stock)	Typ	Wirt	VD	Diluent	kDa
Akt-1 (B-1)	200 µg/ml	mAK	Ms	1:500	BSA	62
beta-Aktin	k.A.	pAK	Rb	1:10000	Milch	42
E-Cadherin	250 µg/ml	mAK	Ms	1:5000	BSA	135
GAPDH (HRP-konjugiert)	k.A.	pAK	Rb	1:5000	BSA	38
GSK-3beta (D5C5Z)	k.A.	mAK	Rb	1:1000	BSA	46
Lamin A/C	k.A.	pAK	Rb	1:1000	BSA	28, 70
Na <sup>+</sup> -,K <sup>+</sup> -,ATPase	k.A.	pAK	Rb	1:1000	BSA	100
N-Cadherin	250 µg/ml	mAK	Ms	1:1000	BSA	140
p-Akt (Ser473)	k.A.	pAK	Rb	1:1000	BSA	60
PD L1 (E1L3N) (Lot7)	874 µg/ml	mAK	Rb	1:1000	Milch	40-50
p-GSK-3beta (Ser09)	k.A.	mAK	Rb	1:1000	BSA	46
Rho	1086 µg/ml	mAK	Rb	1:2500	Milch	21
Vimentin	k.A.	mAK	Rb	1:1000	BSA	57

**Tabelle 23** Für die WB-Analyse verwendete Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikä	c (Stock)	Typ	Wirt	VD
Goat anti-Mouse IgG	10 µg/mL	pAK	Gt	1:1000
Goat anti-Rabbit IgG	10 µg/mL	pAK	Gt	1:1000
Mouse TrueBlot®	1000 µg/mL	mAK	Rt	1:1000
Rabbit TrueBlot®	1000 µg/mL	k.A.	Ms	1:1000



Für die WB-Analyse verwendete Puffer:

**Tabelle 24** 5 % Lämmli-Puffer (5x)

Komponente	Menge
1,5M Tris pH 6,8	4 ml
300 mM Glycerol	10 ml
SDS	2 g
Bromphenolblau	1 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 ml

**Tabelle 25** 10x SDS-PAGE-Puffer, 1 L

Komponente	Menge
Tris pH 8,5	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 %
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

**Tabelle 26** 1x SDS-PAGE-Puffer, 1 L

Komponente	Menge
10x SDS-PAGE-Puffer	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

**Tabelle 27** 10x Blotting-Puffer, 1 L

Komponente	Menge
Tris pH 8,5	250 mM
Glycin	1,92 M
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

**Tabelle 28** 1x Blotting-Puffer, 1 L

Komponente	Menge
10x Blotting-Puffer	100 ml
Methanol	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

**Tabelle 29** 10x TBS pH 7,5, 1 L

Komponente	Menge
Tris base	200 mM
NaCl	1,5 M
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

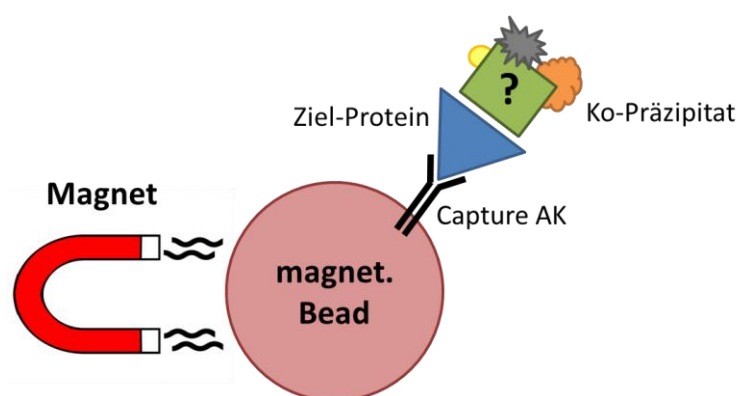
**Tabelle 30** 1x TBST, 1 L

Komponente	Menge
10x TBS	100 ml
TWEEN® 20	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

### 2.2.3.3 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) wurde mit der *magnetic-activated cell sorting* (MACS)-Technologie, nach Herstellerangaben durchgeführt. 50 µg µMACS Protein A MicroBeads (Miltenyi Biotec) wurden mit 1 µg Capture-AK beschichtet. Die verwendeten AK sind in **Tabelle 31** aufgelistet. Im Anschluss wurden 200 µg Protein-Lysat zugegeben und alles zusammen für 30 Min auf Eis inkubiert. Um sicherzustellen, dass die Analyse nicht durch unspezifische Bindungen anderer Proteine verfälscht wird, wurden zusätzlich Beads mit einem IgG-Isotyp-Capture-AK (CST) ohne AK oder ohne Lysat inkubiert.

µSäulen (Miltenyi Biotec) wurden in den magnetischen thermoMACS Separator (Miltenyi Biotec) eingesetzt. Die Säulen wurden mit gekühltem, 1:10 verdünntem RIPA-Puffer equilibriert und anschließend das Bead-Lysat-Gemisch auf die Säule überführt. Die magnetischen Beads wurden von der Säule zurückgehalten und nicht-gebundene Proteine wurden in mehreren Waschschritten mit gekühltem, 1:10 verdünntem RIPA-Puffer entfernt. Die an magnetische Beads gebundenen Proteine wurden mit heißem (95°C) Lämmli-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol (Merck) eluiert und für 5 Min bei 95°C denaturiert. Zwei Drittel der Probe wurde für eine WB-Analyse eingesetzt. **Abbildung 27** stellt das Prinzip der Ko-Immunpräzipitation schematisch dar.



**Abbildung 27** Schematische Darstellung der Ko-Immunpräzipitation. Magnetische Beads werden mit einem Capture-AK markiert, der spezifisch ein Ziel-Protein bindet. Mit dem Ziel-Protein interagierende Proteine bleiben ebenfalls gebunden (Ko-Präzipitat). Durch einen Magneten werden magnetische Beads zurück gehalten und auf diese Weise von nicht-gebundenen Bestandteilen des Lysats separiert. Im Eluat befinden sich nur die ursprünglich an die Beads gebundenen Bestandteile.

Da sich bei der Elution der gebundenen Proteine auch der Capture-AK von den Beads löst und sich mit im Eluat befindet, kann in der WB-Analyse auch der Capture-AK detektiert werden und zu störenden Banden bei der Detektion führen. Durch die Denaturierung zerfällt der AK in seine Hauptkomponenten, die leichte und die schwere Kette. Ein herkömmlicher Sekundär-AK würde den Capture-AK unspezifisch auf der 50 kDa und 25 kDa Bande detektieren. Daher musste hier nach der Ko-IP die Membran mit speziellen Trueblot-Sekundär-AK (Rockland Immunochemicals Inc.) mit HRP-Konjugat inkubiert werden, welche die schwere und leichte Capture-AK-Kette nicht detektieren. Für den Protein-Nachweis wurde Roti Lumin (Roth) oder SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) verwendet.

#### 2.2.3.3.1 GSK-3 $\beta$ Präzipitation mit PD-L1 Nachweis

Zum Nachweis von GSK-3 $\beta$ , als direkten Bindungspartner von PD-L1, diente anti-GSK-3 $\beta$  (D5C5Z) (CST) als Capture-AK der Ko-IP mit anschließender PD-L1 Detektion (PD-L1 (E1L3N) (CST). GSK-3 $\beta$  diente auf demselben Blot als Ladekontrolle.

#### 2.2.3.3.2 PD-L1 Präzipitation mit Akt-1 Nachweis

Zum Nachweis von Akt-1, als direkten Bindungspartner von PD-L1, diente PD-L1 (E1L3N) (CST) als Capture-AK der Ko-IP, mit anschließender Akt-1 (Abcam) Detektion. PD-L1 diente auf demselben Blot als Ladekontrolle.

#### 2.2.3.3.3 Kontrollen

Um unspezifische Bindungen und damit falsch-positive Signale eindeutig auszuschließen, wurden drei methodische Kontrollen durchgeführt. Die Beads wurden mit einer IgG-Isotyp-Kontrolle inkubiert, um unspezifische Bindungen des AK-Grundgerüsts auszuschließen. Ebenfalls wurden Beads ohne AK inkubiert, um eine unspezifische Bindung von Proteinen an die Beads auszuschließen. Außerdem wurden Beads ohne Lysat inkubiert, um eine Verunreinigung durch den verwendeten Puffer auszuschließen.

**Tabelle 31** Für die MACS-Analyse verwendete Capture-Antikörper

Capture-Antikörper	Konzentration	Typ	Wirt	Einsatz
Akt-1 (B-1)	200 $\mu\text{g/ml}$	mAK	Ms	1:100
GSK-3beta (D5C5Z)	k.A.	mAK	Rb	1:50
IgG aus Rabbit Serum	1340 $\mu\text{g/mL}$	pAK	Rb	1:75
PD L1 (E1L3N) Lot#7	874 $\mu\text{g/ml}$	mAK	Rb	1:50

### 2.2.3.4 Durchflusszytometrie

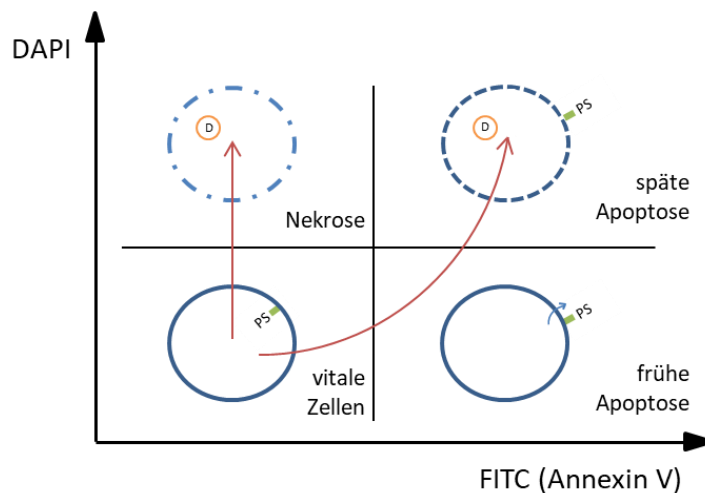
Durchflusszytometrische (engl.: *fluorescence-activated cell scanning*, FACS) Experimente wurden am FACSCanto-II Durchflusszytometer (BD Biosciences) mit der FACSDiva Software 7.0 (BD Biosciences) durchgeführt. Punktdiagramme und überlagerte Histogramme wurden mit der Flowing Software 2.5.1 (Turku, Universität Turku, FIN) erstellt. Für alle FACS-Experimente wurden die Zellen in 6-Well Platten (Greiner Bio-One) ausgesät. Die für die Aussaat gewählten Zellzahlen variierten, je nach Behandlung und Erntezeitpunkt, zwischen  $5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well. Ziel war es die Zellzahl bei der Aussaat so zu wählen, dass sich die Zellen zum Erntezeitpunkt in einem subkonfluenten Zustand befanden. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen durch Inkubation mit Accutase-Lösung (Sigma-Aldrich), für 5-10 Min bei 37°C, in Suspension gebracht. Im Gegensatz zu Verwendung von Trypsin ist ein Abstoppen der Reaktion bei Akkutase nicht nötig. In diesem Fall wurde die Reaktion durch Verdünnung der Lösung gestoppt.

#### 2.2.3.4.1 Apoptose-Assay

Für den Apoptose-Assay wurden sowohl die adhärenenten, als auch die abgelösten, sich im Zellüberstand befindlichen Zellen, in die Messung miteinbezogen. Zügiges Arbeiten und ein schonender Umgang mit den Zellen waren hier essenziell für eine optimale Durchführung des Experiments. Vor der Ernte wurden die Zellen nicht gewaschen, um einen Verlust an Zellen zu vermeiden. Nach der Ernte wurden die Zellen durchgehend bis hin zur Messung, auf Eis bzw. bei 4°C gekühlt. Auch die verwendeten Puffer waren gekühlt. Zu den geernteten Zellen wurde FACS-Puffer (**Tabelle 34**) gegeben und diese für 3 Min mit 300 rcf (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden laut Herstellerprotokoll mit 5 µl Fluorescein (FITC)-konjugiertem Annexin V (ImmunoTools) in 70 µl Annexin-Binding-Buffer, für 15 Min inkubiert. Danach wurde mit 200 µl Annexin-Binding-Buffer (**Tabelle 33**) aufgefüllt. 1-2 Min vor der Messung wurden die Annexin V-gefärbten Zellen zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) versehen.

Durch diese Annexin V-DAPI-Doppelfärbung kann zwischen vitalen Zellen, Zellen im frühen oder späten Apoptose-Stadium, sowie nekrotischen /sehr spät-apoptotischen Zellen unterscheiden werden. Annexin V ist ein Protein, das unter Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin ist ein Glycerophospholipid, das die Zelle nur nach außen präsentiert, sobald Apoptose induziert wird (*membrane flip-flop*). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur membrangängig ist, falls die Zelle ihre Membranintegrität

verloren hat. Dies trifft allerdings nur für die ersten Minuten nach Inkubationsbeginn zu. Im Zellinneren interkaliert DAPI in doppelsträngige DNA und erzeugt dort ein detektierbares Signal. **Abbildung 28** stellt das Prinzip der Zelltod-Bestimmung mittels FACS-Analyse schematisch dar:



**Abbildung 28** Schematische Darstellung der Zelltod-Messung mittels Durchflusszytometrie.

Vitale Zellen, die eine intakte Membran besitzen, sind doppelt-negativ für DAPI und Annexin V. Diese Zellen werden sich im linken, unteren Quadranten dargestellt.

Induziert die Zelle den programmierten Zelltod, wird im frühen Apoptose-Stadium Phosphatidylserin durch einen Membranflip nach außen gedreht und zugänglich für eine Annexin V Bindung. Da die Zelle im frühen Apoptose-Stadium noch über eine intakte Membran verfügt, kann der Farbstoff DAPI nicht in die Zelle eindringen. Früh-apoptotische Zellen sind daher Annexin V-positiv, aber DAPI-negativ und werden im rechten unteren Quadranten dargestellt.

Befindet sich die Zelle im spät-apoptotischen Stadium verliert sie zunehmend ihre Membranintegrität und wird zugänglich für DAPI. Befindet sich DAPI im Zellinneren, interkaliert dieser Farbstoff in doppelsträngige DNA und erzeugt ein detektierbares Signal. Spät-apoptotische Zellen sind daher doppelt-positiv für Annexin V und DAPI und werden im rechten oberen Quadranten dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit den Zelltod zu induzieren ist, neben dem programmierten Zelltod, die Nekrose. Die Zelle verliert sofort ihre Membranintegrität. Sie wird DAPI-positiv, während sie für Annexin V negativ bleibt. Nekrotische Zellen werden im linken oberen Quadranten dargestellt. (Auch „sehr“ spät-apoptotische Zellen können in diesem Quadranten erscheinen.)

#### 2.2.3.4.2 PD-L1-Membranexpression

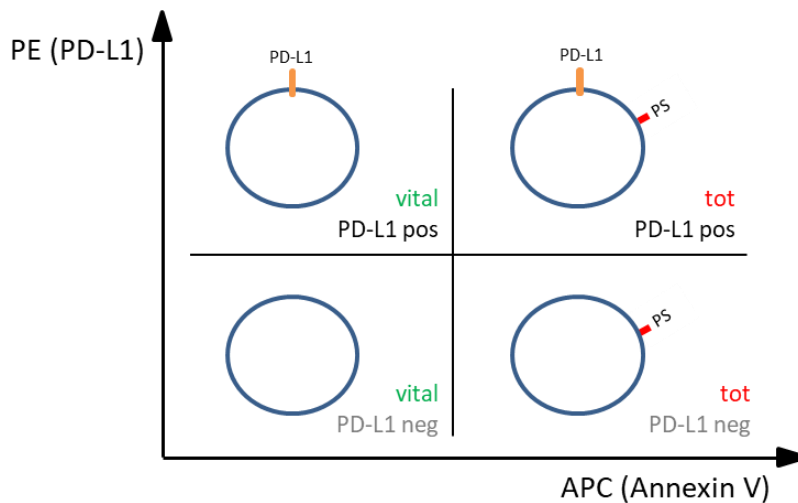
Für die Analyse der PD-L1-Basalmembranexpression wurden lebende Zellen mit intakter Zellmembran verwendet, die vor der Analyse weder fixiert, noch permeabilisiert wurden. Vor der Ernte wurden die Zellen mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen. Nach der Ernte wurden  $5 \times 10^5$  Zellen für 30 Min bei 4°C, mit 2 µg/ml des Phycoerythrin (PE)-konjugiertem anti-CD274-Antikörper (AK) (Klon 29E.2A3, BioLegend, San Diego, CA, USA) in 50 ml FACS-Puffer (**Tabelle 32**) inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde das entsprechende Maus-Immunglobulin IgG2b,κ PE (Klon MPC-11, BioLegend) verwendet. Nach der AK-Inkubation wurden ungebundene AK durch einen Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer, entfernt. Die Zellen wurden für 3 Min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert.

Zur Bestimmung der PD-L1-Membranexpression nach der Bestrahlung wurden die Zellen 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung geerntet und analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Diese Zellen wurden, abgesehen von der Bestrahlung, identisch behandelt.

#### 2.2.3.4.3 PD-L1-Annexin V-Doppelfärbung

Für eine PD-L1-Annexin V-Doppelfärbung wurden sowohl die adhärenenten als auch die abgelösten, apoptotischen und sich im Überstand befindlichen Zellen, in die Messung miteinbezogen. Zügiges Arbeiten und ein schonender Umgang mit den Zellen waren hier wieder essenziell für die optimale Durchführung des Experiments. Vor der Ernte wurden die Zellen nicht gewaschen, um unnötige Strapazierung der Zellen zu vermeiden und keine Zellen zu verlieren. Nach der Ernte wurden die Zellen ununterbrochen, bis hin zur Messung, gekühlt. Auch die verwendeten Puffer wurden gekühlt.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden für 30 Min bei 4°C mit 2 µg/ml des mit PE-konjugierten anti-CD274-AK (Klon 29E.2A3, BioLegend) oder der entsprechenden Isotyp-Kontrolle PE-Maus-IgG2b,κ (clone MPC-11, BioLegend), in 50 µl FACS-Puffer, inkubiert. Um ungebundene AK zu entfernen wurden die Zellen im Anschluss mit 2 ml FACS-Puffer (**Tabelle 34**) gewaschen, für 3 Min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde, laut Herstellerprotokoll, mit 5 µl Allophycocyanin (APC)-konjugiertem Annexin V (ImmunoTools) in 70 µl Annexin-Binding-Buffer (**Tabelle 36**) 15 Min lang inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µl Annexin-Binding-Buffer ausgefüllt und gemessen. Die Zellen wurden 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy analysiert. Zur Signalquantifizierung wurde der Delta Staining Index ( $\Delta SI$ ) berechnet.

**Abbildung 29** stellt das Prinzip der PD-L1-Annexin V-Doppelfärbung schematisch dar:



**Abbildung 29** Schematische Darstellung der PD-L1-Annexin V-Doppelfärbung.

Nur membranständiges PD-L1 wurde vom AK gebunden und erzeugt ein detektierbares PE-Signal. PD-L1-positive Zellen befinden sich ausschließlich in den beiden oberen Quadranten. Vitale Zellen sind Annexin V-negativ und liegen in den beiden linken Quadranten. Apoptotische Zellen können Annexin V an Phosphatidylserin (PS) binden, werden dadurch APC-positiv und sind in den beiden rechten Quadranten lokalisiert.

#### 2.2.3.4.4 Berechnung des Staining Index

Um unspezifische und damit falsch-positive Signale von PD-L1 zu normalisieren, wird der *Staining Index* (SI) durch Anwendung folgender Formel berechnet:

$$SI = \frac{MFI_{PE (PD-L1)} - MFI_{PE (Iso)}}{2 \times MFI_{PE (SD Iso)}}$$

Von der mittleren Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI) des PDL1 AK (PE konjugiert) werden unspezifische Signale subtrahiert und durch die doppelte Standardabweichung der Isotyp-Kontrolle (SD Iso) dividiert. Auf diese Weise können die unverfälschten, bereinigten PD-L1 Signale dargestellt werden (205).

**Tabelle 32** Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper

FACS-Antikörper	Wirt	c (Stock)	Einsatz
PE anti-human CD274 (29E.2A3)	Ms	400 µg/µl	1:200
PE Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl (MPC-11)	Ms	200 µg/µl	1:100

**Tabelle 33** Für die FACS-Analyse verwendete Reagenzien

Reagenz	c (Stock)	Einsatz
Annexin V - PE konjugiert	k.A.	5 µl auf 70 µl Puffer
Annexin V - APC konjugiert	k.A.	5 µl auf 70 µl Puffer
DAPI	50 µg/ml	10 µl von 1:10 VD

Für die FACS-Analyse verwendete Puffer:

**Tabelle 34** FACS-Puffer, 50ml

Komponente	Menge
PBS	495 ml
FCS	5 ml

**Tabelle 35** 10x Annexin-Binding Puffer pH 7,4, 200 ml

Komponente	Menge
HEPES	4,766 g
NaCl	16,363 g
CaCl <sub>2</sub>	0,555 g
H <sub>2</sub> O	ad. 200 ml

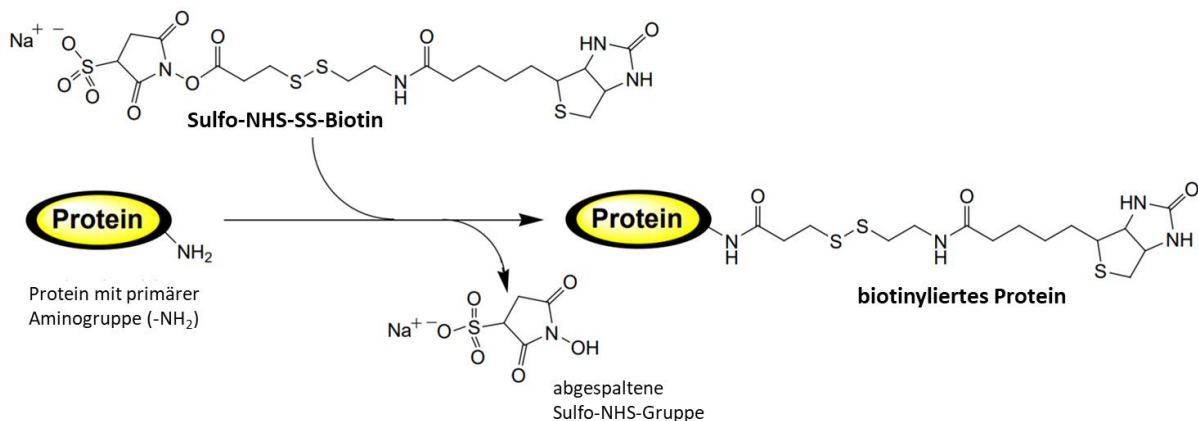
**Tabelle 36** 1x Annexin-Binding-Buffer, 50ml

Komponente	Menge
10x Annexin-Binding-Buffer	45 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml



### 2.2.3.5 Isolation von Membranproteinen

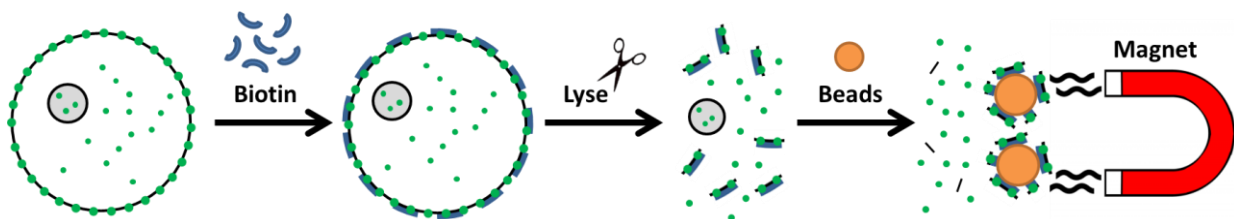
Die Isolation von Membranproteinen erfolgte unter Verwendung von Sulfosuccinimidyl-2-(Biotinamido)-Ethyl-1,3-dithiopropionat (Premium-Grade - Sulfo-NHS-SS-Biotin - Lösung, Thermo Scientific) (206,207). Die Zellen wurden für den Versuchsansatz in T75-Kulturflaschen ausgesät (Corning, NY, USA). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Das Kulturmedium wurde unmittelbar nach der Bestrahlung gewechselt. Vier und 72 Std nach der Bestrahlung wurden die Zellen analysiert. Dafür wurden die adhärennten Zellen mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und mit Accutase (Sigma-Aldrich) für 5-10 Min bei 37°C von der Zellkulturflasche gelöst.  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml PBS (Sigma-Aldrich) wurden mit 80 µl einer 10 mM der Sulfo-NHS-SS-Biotin- Lösung (Thermo Scientific) für 30 Min bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Die N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Estergruppe reagierte mit dem ε-Amin der Lysin-Reste. **Abbildung 30** zeigt die ablaufende Reaktion.



**Abbildung 30** Chemische Reaktion bei der Interaktion von Protein mit Sulfo-NHS-SS-Biotin. Modifiziert nach Thermo Scientific- Instructions des EZ-Link™Sulfo-NHS-SS-Biotinylation Kit.

Mit 25 mM eiskaltem TRIS (pH 8,8) wurde die Reaktion abgestoppt (Quenching) und die Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS (Sigma-Aldrich) vom ungebundenen Sulfo-NHS-SS-Biotin befreit. Die Zellen wurden mit 220 rcf bei 4°C für 5 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für 15 Min mit 900 ml Lyse-Puffer (**Tabelle 39**) resuspendiert. Um die Lyse zu unterstützen wurden die Zellen für 10 Min bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert, was ein Aufplatzen der Zellen zur Folge hatte.

Gemäß Hersteller-Protokoll wurden 150  $\mu\text{l}$  *NanoLink Streptavidin Magnetic Beads* (TriLink Biotechnology, San Diego, CA, USA) vorbereitet, mit dem Zellüberstand gemischt und für 30 Min unter langsamer Rotation bei RT, inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads zweimal mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Um die Beads bei diesem Vorgang im Tube (Eppendorf) zu halten, wurden diese für 2-3 Min in einen Magnetständer (Merck) eingesetzt. Nach Eliminierung der nicht-gebundenen Zellfragmente wurde die Membranfraktion von den magnetischen Beads durch Aufkochen in 100  $\mu\text{l}$  1x Lämmli-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck), bei 70°C für 10 Min, eluiert. 25  $\mu\text{l}$  der Membranfraktion wurden für die WB-Analyse eingesetzt. Die Membranexpression von PD-L1 wurde mit dem monoklonalen Rabbit-AK PD-L1 (E1L3N) (CST) bestimmt. Die Inkubation mit einem AK, gerichtet gegen Na-, K-, ATPase (CST), diente als Ladekontrolle. **Abbildung 31** zeigt schematisch die Isolation von Membranproteinen mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin.



**Abbildung 31** Isolation von Membranproteinen mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin. Primäre Aminogruppen ( $-\text{NH}_2$ ) von Lysin-Resten der Membranproteine werden markiert. Da das negativ geladene Reagenz die Membran nicht passieren kann, werden ausschließlich Membranproteine und keine Proteine des intrazellulären Bereichs markiert. Die Inkubation erfolgt bei 4°C, um die Membranaktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Markierte Membranproteine werden durch die Bindung an magnetische Streptavidin-Beads aus dem Zell-Lysat selektiert. Die Verwendung von Reduktionsmitteln, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol macht die Bindung des Biotins reversibel und die Membranproteine können mittels WB-Analyse näher untersucht werden.

Für die Membran-Selektionierung verwendete Puffer:

**Tabelle 37** Waschpuffer: PBS pH 8,0

Komponente	Menge
PBS pH 7,4	250 ml
5 M NaOH	ca. 420 $\mu$ l

**Tabelle 38** Quenching: 25 mM TRIS pH 8,0

Komponente	Menge
TRIS	0,197 g
5 M NaOH	ca. 80 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	50 ml

**Tabelle 39** Lyse-Puffer

Komponente	Menge
25 mM TRIS pH 7,6	2,5 ml
150 mM NaCl	150 $\mu$ l
0,1 % SDS	10 $\mu$ l
0,5 % Nonidet P-40	50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,29 ml
cOmplete Protease-Inhibitor	1 Tablette

**Tabelle 40** 1x Lämmli-Puffer

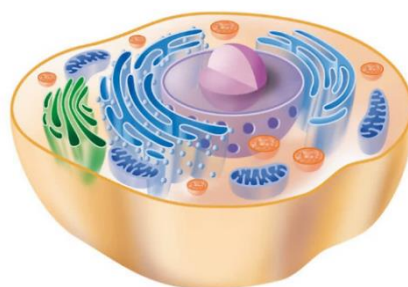
Komponente	Menge
5x Lämmli-Puffer	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	80 $\mu$ l

### 2.2.3.6 Zellfraktionierung

Um die Zellen in ihre unterschiedlichen Fraktionen aufzutrennen, wurden sie in T75-Kulturflaschen ausgesät (Corning). 24 Std nach der Aussaat wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten wiederum als Kontrolle. Die subzellulären Fraktionen wurden 48 Std nach Bestrahlung bei 70 % Konfluenz mit dem *ProteoExtract Subcellular Extraction Kit* (Merck) und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und unterschiedlicher Zentrifugations-Schritte gemäß dem Herstellerprotokoll gewonnen. **Abbildung 32** zeigt den schematischen Aufbau einer eukaryotischen Zelle. Mit den im Kit enthaltenen Puffern wurden die Zellen, über vier Zentrifugations-Schritte (SIGMA Typ 3K30, SIGMA Laborzentrifugen GmbH), in die Fraktionen Membran, Zytoplasma, Zytoskelett und Kern aufgetrennt.

Die Proteine der Kern- und Zytoplasma-Fraktion wurden in 100 % Aceton (Merck) bei -20°C über Nacht gefällt und in RIPA-Lyse-Puffer (**Tabelle 19**) mit Protease-Inhibitoren (cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) resuspendiert. Die Protein-Konzentration wurde durch einen BCA-Assay (Merck) bestimmt. 30 µg der Kern- bzw. Zytoplasma-Proteine wurden für eine WB-Analyse eingesetzt. Die Proben wurden durch Lämmli-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol (Merck), bei 70°C, für 10 Min denaturiert.

Die nukleäre und zytosolische Expression von PD-L1 in den Zellfraktionen wurden mit dem monoklonalen Kaninchen-AK PD-L1 (E1L3N) (CST) bestimmt. Danach wurde der PD-L1-AK mittels *ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution* (Merck) von der Membran entfernt. Um eine gleichmäßige Beladung sicherzustellen, wurden die Ladekontrollen auf derselben Membran inkubiert. Der anti-Lamin A/C-AK (CST) wurde als Ladekontrolle der Kernfraktionen verwendet. Der GAPDH-Kaninchen-AK (Abcam) wurde als Ladekontrolle der zytoplasmatischen Fraktion verwendet. Zur Signaldetektion wurde mit einem HRP-konjugierten anti-Rb Sekundär-AK inkubiert (Thermo Scientific).



**Abbildung 32** Schematischer Aufbau einer eukaryotischen Zelle. Grob untergliedern kann man diese Zelle in die Hauptbestandteile Membran, Zytoplasma, Zytoskelett und Kern. Der verwendete Extraktions-Kit erlaubte eine Auftrennung der Zelle in diese vier Fraktionen (208).

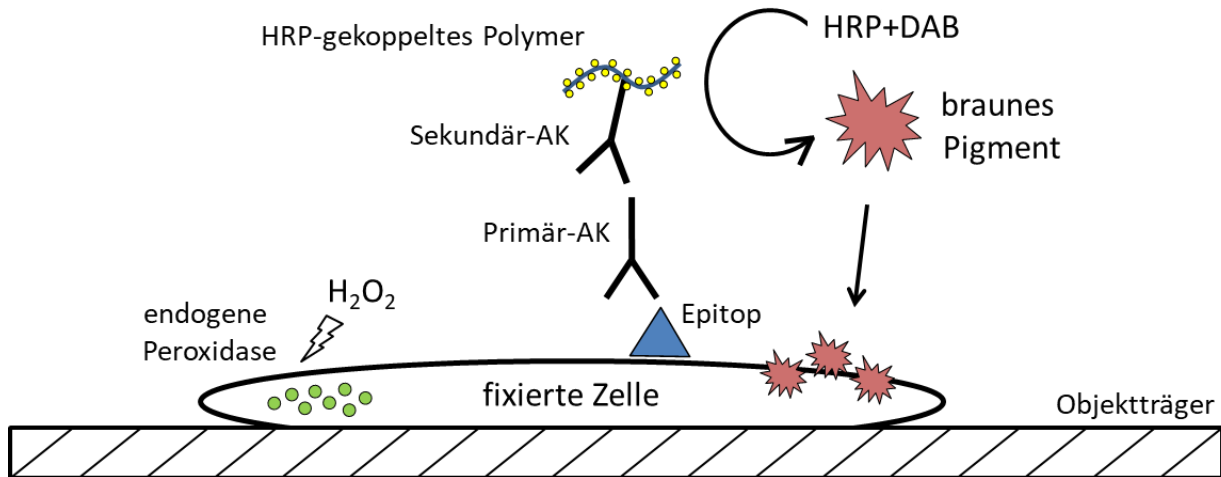
### 2.2.3.7 Histologie

#### 2.2.3.7.1 DAB-Färbung

Abhängig vom Erntezeitpunkt wurden  $3 \times 10^4$  oder  $3 \times 10^5$  Zellen in Falcon® 4-Well Culture Slides (BD Biosciences) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Vier und 72 Std nach der Bestrahlung wurden die Zellen analysiert.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd (PFA, min. 37 %, Merck) in PBS (Gibco) (**Tabelle 41**) für 10 Min fixiert. Um neben der Membran-Färbung auch eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen, wurden die Zellen 60 Sekunden mit 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBST (**Tabelle 42**) permeabilisiert. Um Hintergrundsignal zu reduzieren wurde die endogene Peroxidase-Aktivität blockiert. Dazu wurden die Zellen mit 10 %-iger Wasserstoffperoxidlösung (30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , Sigma) und 10 % Methanol (MeOH 99,9 % Carl Roth) (**Tabelle 43**) für 10 Min bei RT, inkubiert. Um unspezifische Bindestellen vor der AK-Inkubation zu minimieren, wurden die Zellen für 1 Std mit 5 %-Goat Serum (Sigma-Aldrich) in PBST (PBS (Gibco) mit 1 % Tween 20, (Sigma-Aldrich), inkubiert. Der Primär-AK PD-L1 (E1L3N) (CST) wurde auf eine Konzentration von 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 3 % BSA (Biomol) in PBS (Gibco) eingestellt und über Nacht bei 4°C, in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein polyklonaler IgG-AK (Sigma Aldrich) in gleicher Konzentration verwendet. Zur Signaldetektion wurden die Objektträger mit EnVision + Dual Link System-HRP (DAKO) für 10 Min inkubiert. Die Immundetektion wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin-(DAB)-Tabletten (Sigma-Aldrich) gemäß, Herstellerangaben durchgeführt. Die Objektträger wurden für etwa 10 Min mit dem DAB-Reagenz inkubiert, bis die entstandene Braunfärbung ausreichend sichtbar war. Anschließend wurde die Reaktion mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gestoppt. **Abbildung 33** zeigt das Prinzip der DAB-Färbung.

Zuletzt wurden die Objektträger mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, welches den fluoreszierenden Farbstoff DAPI (Vector Laboratories) enthielt, benetzt und mit einem *High Precision* Deckglas 1.5H (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) eingedeckt. Ziel war es die Kerne der DAB-gefärbten Zellen mit dem DNA-Farbstoff DAPI sichtbar zu machen, um somit eine zuverlässige Bestimmung der Zellzahl zu ermöglichen.



**Abbildung 33** Prinzip der DAB-Färbung. Zellen werden auf dem Objektträger fixiert. Es folgt eine spezifische AK-Bindung an das Ziel-Protein. Um diese Bindung optisch sichtbar zu machen wird an den Primär-AK ein Sekundär-AK gekoppelt, der ein HRP-gebundenes Polymer besitzt. DAB wird durch HRP oxidiert und bildet ein in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im normalen Licht detektiert werden kann und nicht ausbleicht.

Die Zellen wurden bei 4x Vergrößerung mit dem Eclipse TE2000-U Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Tokyo, J), bei einer Adsorption von 360 nm und einer Emission von 460 nm Fluoreszenz sowie in Hellfeldbeleuchtung, digital fotografiert. Die Fluoreszenz-Aufnahme ermöglichte die Ermittlung der Gesamtzellzahl anhand der fluoreszierenden Kerne. Die Hellfeld-Aufnahme ermöglichte die Auszählung der PD-L1-positiven Zellen. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ 1.8.0 (National Institutes of Health, San Jose, CA, USA).

#### 2.2.3.7.2 HE-Färbung

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalauns eine intensive färbende Eigenschaft entwickelt. Hämalaun färbt alle Strukturen, die sauer oder basophil sind, wie DNA, Zellkerne, Ribosomen und das raue ER. Eine pH-Erhöhung durch Leitungswasser im direkten Anschluss verleiht den gefärbten Strukturen die typische Blaufärbung („Bläuen“). Als Gegenfärbung dient Eosin, ein synthetischer Farbstoff, der alle Zellstrukturen rot färbt, die basisch oder acidophil sind. Dazu gehören vor allem die Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum und Kollagen.

Die adhärennten Zellen wurden zunächst auf den 4-Well Culture Slides (BD Biosciences) mit 2 % PFA in PBS (Gibco) (**Tabelle 41**) für 10 Min fixiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit H<sub>2</sub>O zu je 2 Min.

Für die Kernfärbung wurden die Slides 5 Min in Hämalaun (Carl Roth) inkubiert. Zum Bläuen wurden die Objektträger für 10 Min in fließendes Leitungswasser gestellt. Die Gegenfärbung in 1 % wässriger Eosinlösung (Carl Roth) dauerte 1 Min. Überschüssige Färbelösung wurde in einem kurzen Waschschriff in H<sub>2</sub>O entfernt. Vor dem Eindecken wurden die gefärbten Zellen mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert: 10 Sekunden 70 % Ethanol, weitere 10 Sekunden 96 % Ethanol und zuletzt zweimal mit 100 % Ethanol für jeweils 2 Min. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Slides noch für 1–2 Min mit Xylol (Carl Roth) inkubiert und im Anschluss mit dem Xylol-haltigen Eindeckmedium Vitro-Clud® (R. Langenbrinck GmbH) eingedeckt.

Für die Histologie verwendete Puffer:

**Tabelle 41** Fixierlösung, 4 % PFA

Komponente	Menge
Paraformaldehyd (PFA)	4 g
PBS	100 ml

**Tabelle 42** Permeabilisierungs-Puffer DAB 0,1 % Triton

Komponente	Menge
PBS	49,95 ml
Triton X 100	50 µl

**Tabelle 43** Puffer zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase

Komponente	Menge
PBS	3 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 µl
MeOH	500 µl

## 2.2.4 Funktionelle Assays

### 2.2.4.1 MTT-Proliferations-Assay

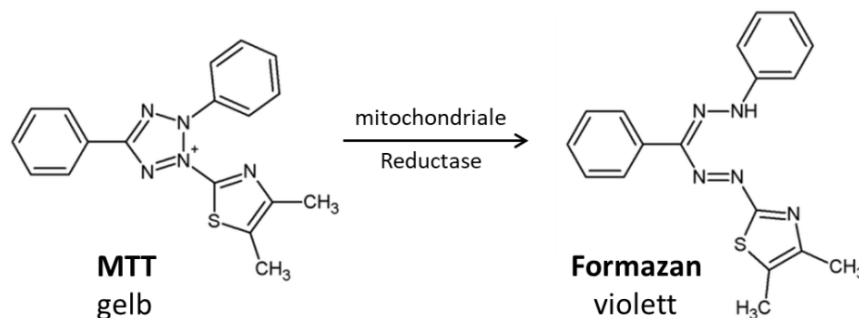
Die Bestimmung der inhibitorischen Konzentration des PI3K-Inhibitors Buparlisib (Selleck Chemicals) wurden mit dem MTT-Proliferations-Assay (R&D Systems) ermittelt. Voraussetzung für die korrekte Ermittlung der Proliferationsrate ist, dass den Zellen in der Kulturschale genügend Platz für die Ausbreitung geben ist. Um die Zellen bis zur Messung subkonfluent zu halten, wurden, abhängig von Zellgröße und Proliferationsrate jeder einzelnen Zelllinie, sowie der Dauer der Inkubation, zwischen 800 und 4000 Zellen pro Well, in einem Volumen von 100  $\mu$ l, in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) ausgesät und über Nacht kultiviert. **Tabelle 44** bietet eine Übersicht über Zellzahlen und Inkubationsdauer.

**Tabelle 44** Eingesetzte Zellzahl zur Bestimmung der Proliferationsrate mittels MTT-Assay

Inkubation/ Zelllinie	48 Std	72 Std	96 Std
PCI 1	3.000 Zellen	2.000 Zellen	1.000 Zellen
PCI 9	3.000 Zellen	2.000 Zellen	1.000 Zellen
PCI 13	2.000 Zellen	1.000 Zellen	800 Zellen
PCI 8	3.000 Zellen	2.000 Zellen	1.000 Zellen
PCI 15	2.000 Zellen	1.000 Zellen	800 Zellen
PCI 52	4.000 Zellen	3.000 Zellen	2.000 Zellen

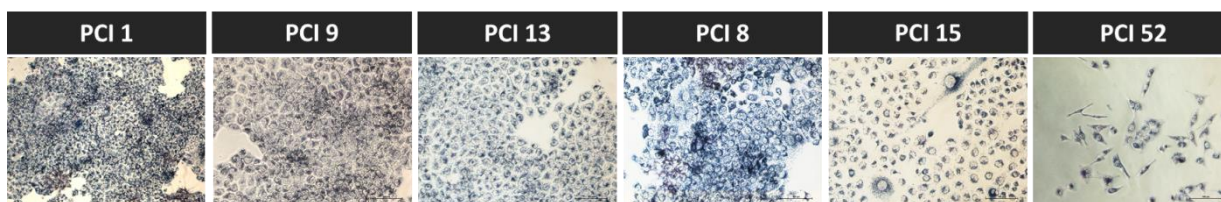
24 Std nach der Aussaat wurde das für die Aussaat verwendete Kulturmedium durch 100  $\mu$ l Kulturmedium mit Inhibitor ersetzt. Zur Errechnung der inhibitorischen Konzentration wurden, laut Herstellerangaben, zu jedem Messzeitpunkt 10  $\mu$ L des 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)-Reagenz in jedes Well gegeben und die Zellen für 120 Min bei 37°C inkubiert. Wie in **Abbildung 34** dargestellt, wandelt das mitochondriale Reduktase-System MTT zu Formazan um. Die Menge des löslichen, violetten Formazan-Farbstoffs korreliert mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen.





**Abbildung 34** Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan, durch das mitochondriale Reduktase-System. Mit steigender Anzahl metabolisch aktiver Zellen steigt auch die Enzymaktivität in direkter Korrelation. Gemessen wird der Farbumschlag, bzw. die Absorption, bei 595 nm.

**Abbildung 35** zeigt die Färbung der Zellen durch MTT-Reagenz (R&D Systems) am Ende der Inkubationszeit. Um eine genaue Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit dem Plattenphotometer (Tecan Group) zu ermöglichen, wurde der Farbstoff aus den Zellen gelöst. Dazu wurden zu den 100  $\mu$ l Kulturmedium weitere 100  $\mu$ L Detergens (im Kit enthalten) in jedes Well gegeben und die Platten über Nacht bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dabei vollständig lysiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Zur Subtraktion von Hintergrundsignalen dienten Wells, die ausschließlich Kulturmedium, aber keine Zellen enthielten, der sog. *blank*. Die prozentuale Viabilität wurde durch Normalisierung der Absorptionswerte auf Zellen errechnet, die in reinem Kulturmedium, ohne Inhibitor, kultiviert wurden.

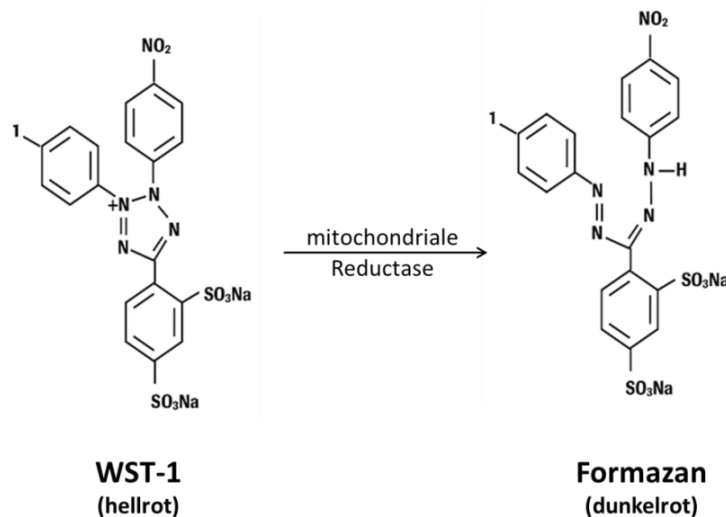


**Abbildung 35** Mikroskopische Aufnahmen der Zelllinien PCI 1, 9, 13, 8, 15, und 52. Die Färbung der Zellen resultierte aus der zweistündigen Inkubation mit MTT-Reagenz. Darstellung in 10x Vergrößerung

Die IC<sub>50</sub>-Werte von 48, 72 und 96 Std, sowie die IC<sub>75</sub>-Werte von 72 Std Inhibitor-Inkubation wurden für jede Zelllinie mit der Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) berechnet. Für alle Experimente wurden die IC<sub>50</sub>- und IC<sub>75</sub>-Werte auf die nächste Hunderterstelle gerundet.

### 2.2.4.2 WST-1 Proliferations-Assay

Zu Bestimmung der Zellvitalität wurde ein WST-1 Proliferations-Assay mit dem *Cell Proliferation Reagent* WST-1 (Sigma Aldrich), nach Herstellerangaben, durchgeführt. Dazu wurden 2000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde das Kulturmedium in allen Wells durch 100 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Gemessen wurde 24, 36, 48, 72, 96 und 120 Std nach der Bestrahlung. Um zu jedem Zeitpunkt optimale und konstante Wachstumsbedingungen aufrechtzuerhalten, wurde alle 24 Std die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Kulturmedium ersetzt. Zum Messzeitpunkt wurden zu den 100 µl Kulturmedium 10 µl WST-1-Reagenz (Sigma Aldrich) hinzugefügt und für 3 Std im Brutschrank (HERAcell 240, Thermo Scientific), bei 37°C inkubiert. Wie in **Abbildung 36** dargestellt, wandelte das mitochondriale Reduktase-System WST-1 zu Formazan um. Die Menge des löslichen, hier dunkelroten, Formazan-Farbstoffs korrelierte mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Die Absorption, bzw. die OD wurde bei 450 nm mit einem Plattenphotometer (Tecan Group) gemessen. Um Hintergrundsignale subtrahieren zu können, wurde in einigen Wells die OD ausschließlich von Kulturmedium mit WST-1-Reagenz, ohne Zellen, gemessen.



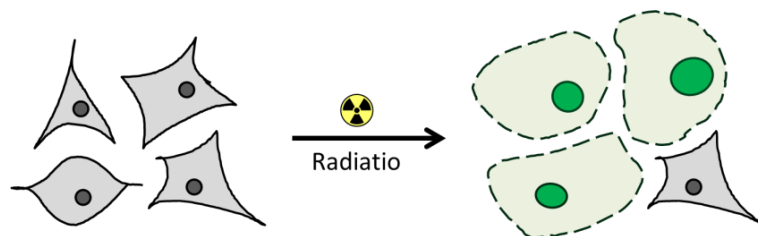
**Abbildung 36** Spaltung von 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat (WST-1) zu Formazan, durch das mitochondriale Reduktase-System. Mit steigender Anzahl metabolisch aktiver Zellen steigt auch die Enzymaktivität in direkter Korrelation. Gemessen wird der Farbumschlag, bzw. die Absorption, bei 450 nm.

### 2.2.4.3 Live Cell Imaging

Die Bestimmung von Konfluenz und Zytotoxizität durch *Live Cell Imaging* wurde mit dem automatisierten Bildgebungssystem IncuCyte Zoom (Essen BioScience) durchgeführt. Dafür wurden, abhängig von der Zelllinie 800–3000 Zellen pro Well in 96-Well Platten (Greiner Bio-One) überführt und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde das Kulturmedium in allen Wells durch frisches Medium ersetzt. Zusätzlich wurde in das Kulturmedium im Verhältnis 1:10.000, der Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 (Essen BioScience) gegeben, der zur Markierung apoptotischer Zellen dient.

Bei YOYO-1 handelt es sich um einen für Zellen mit intakter Membranintegrität undurchlässigen Farbstoff. Verliert die Zelle ihre Membranintegrität, was bei der Induktion des Zelltods gegeben ist, so dringt der Farbstoff in die Zelle ein. Dort interkaliert er in doppelsträngige DNA, wodurch ein detektierbares Signal entsteht. Es handelte sich somit um einen auf der Membranintegrität basierenden Zytotoxizitätstest.

Die Platten wurden für 120 Std im *Live Cell Imager* inkubiert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden die Platten nicht bewegt, auch das Kulturmedium wurde nicht gewechselt. Das Gerät erstellte in regelmäßigen Abständen von 1 Std Bilder der Zellen, in 10xVergrößerung, an zwei unterschiedlichen Stellen des Wells. Die entstandenen Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder wurden mit dem IncuCyte ZOOM basic analyzer (Life Technologies) ausgewertet. Quantifiziert wurde die Konfluenz, also der von Zellen bedeckte, relative Flächenanteil [%] und die Apoptoserate, also die absolute Fläche, besetzt mit grün-fluoreszierenden Objekten [ $\mu\text{m}^2/\text{Bild}$ ]. **Abbildung 37** zeigt das Prinzip dieses Zytotoxizitätstest.



**Abbildung 37** Der membran-impermeable DNA-Farbstoff YOYO-1 färbt ausschließlich Nuklei von Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben. Grund dafür wäre in diesem Beispiel ionisierende Strahlung. Infolge der Bestrahlung leiten radiosensitive Zellen den Zelltod ein. Diese Zellen nehmen unter Umständen auch an Volumen zu und verlieren ihre Membranintegrität, somit dringt der Farbstoff in die Zelle ein und färbt die Nuklei grün. Vitale Zellen können ungehindert in der Anwesenheit von YOYO-1 proliferieren.

## 2.2.4.4 Migrations- und Invasions-Assays

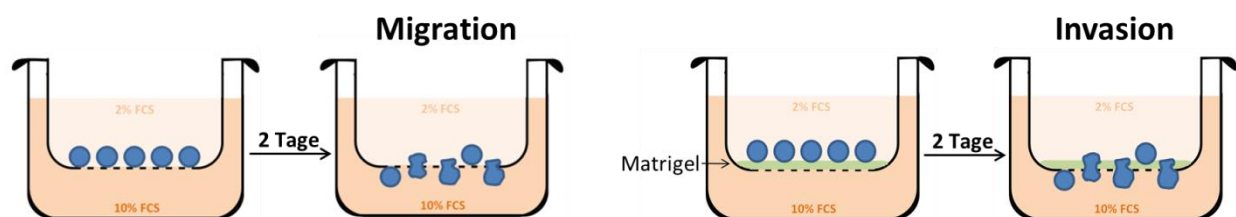
### 2.2.4.4.1 Chemotaxis-Assay

#### 2.2.4.4.1.1 Boyden-Kammer mit chemotaktischem Gradienten

Zur Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen wurde eine Zellkulturschale nach Boyden in zwei Kompartimente geteilt (209). Dies wurde hier durch den Einsatz von ThinCerts (Greiner Bio-One) in die Vertiefungen einer 24-Well Platte (Greiner Bio-One) ermöglicht. Die dadurch entstandenen Kompartimente, nämlich der obere und der unterer Teil des Wells, wurden mit Kulturmedium unterschiedlichen FCS-Gehalts befüllt. 100 µl Kulturmedium mit einer FCS-Konzentration von 2 % wurden in das ThinCert gegeben und 500 µl Kulturmedium mit einer FCS-Konzentration von 10 % in den unteren Teil des Wells. Die beiden Kompartimente waren durch eine permeable Membran mit einer Porengröße von 8 µm verbunden. Dadurch entstand zwischen den beiden Kompartimenten ein FCS-Konzentrationsgradient.

Ziel des Experiments war es herauszufinden, ob Zellen über einen Zeitraum von 48 Std in der Lage sind durch die permeable Membran vom Ort der niedrigeren, zum Ort der höheren Nährstoffkonzentration zu migrieren. Um die Invasionsfähigkeit zu testen wurde die permeable Membran zusätzlich mit Matrigel® (210) beschichtet, einer Laminin-reichen Matrix. Dafür wurde die Matrigel®-Stammlösung (Corning) auf Eis von einem gefrorenen in einen flüssigen Zustand überführt und mit kaltem PBS (Sigma-Aldrich) auf 3 mg/ml verdünnt. Die ThinCerts wurden in eine auf Eis gekühlte 24-Well Platte gesetzt. 50 µl der Verdünnung wurden blasenfrei in das ThinCerts überführt. Das Matrigel® härtete 30 Min lang bei 37°C im Brutschrank aus. Nach dieser Zeit konnte das Experiment gestartet werden.

Für dieses Experiment wurden fünf Sphäroide pro Well platziert. Die Generierung der Sphäroide wird in Abschnitt 2.2.1.4 3D-Zellkultur erläutert. Die Zellen wurden für 48 Std im Brutschrank (HERAcell 240, Thermo Scientific) inkubiert. Der experimentelle Aufbau wird in **Abbildung 38** schematisch dargestellt.



**Abbildung 38** Chemotaxis-Assay nach Boyden. Die Kulturschale wird in zwei Kompartimente getrennt, die durch eine permeable Membran verbunden bleiben. Zellen, die in der Lage sind zu migrieren, folgen dem FCS-Konzentrationsgradienten. Für den Invasions-Assay wurde die permeable Membran zusätzlich mit Matrigel® beschichtet.

#### 2.2.4.4.1.2 Kristallviolett-Färbung

Die migrierten Zellen, wurden am Ende des Experiments fixiert und durch eine Kristallviolett-Färbung angefärbt. Fixiert wurde, nach einmaligem Waschen mit PBS (Sigma-Aldrich) für 30 Min, mit 250 µl 1%igem Glutaraldehyd (Merck) bei RT (**Tabelle 47**). Nach nochmaligem Waschen wurde mit 250 µl einer 0,02%igen Kristallviolett-Lösung (Sigma-Aldrich) für 15 Min bei RT gefärbt (**Tabelle 46**). Überschüssige Farbe wurde nach Ende der Inkubationszeit unter fließendem Wasser entfernt. Die auf Ober- und Unterseite der Membran anhaftenden Zellen waren nach der Kristallviolett-Färbung deutlich in blauer Farbe zu sehen.

#### 2.2.4.4.1.3 Quantifizierung der Migration und Invasion

Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurden die nicht-migrierten/invadierten Zellen auf der Oberseite der permeablen Membran entfernt. Sichtbar waren danach nur noch migrierte/invadierte Zellen, auf der Unterseite der Membran. Diese Zellen wurden vor und nach dem Auswischen fotografiert. Quantifiziert wurden die an der Unterseite anhaftenden, migrierten/invadierten Zellen mit Hilfe der Software ImageJ 1.8.0 (National Institutes of Health). Diese Bilder wurden in eine Schwarz/Weiß-Färbung konvertiert und invertiert. Berechnet wurde die Dichte der integrierten Farbtintensität nach PD-L1-Knockdown bzw. Überexpression, im Vergleich zur Transfektions-Kontrolle. Bilder der Zellen vor dem Auswischen dienten lediglich zur Verifizierung einer einheitlichen Aussaat.

Verwendete Lösungen für die Kristallviolett-Färbung:

**Tabelle 45** 10x Kristallviolett-Lösung, 2 %

Komponente	Menge
Kristallviolett	2 g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

**Tabelle 46** 1x Kristallviolett-Lösung, 0,2 %

Komponente	Menge
2% Kristallviolett	0,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	39,6 ml

**Tabelle 47** Glutaraldehyd, 1 %

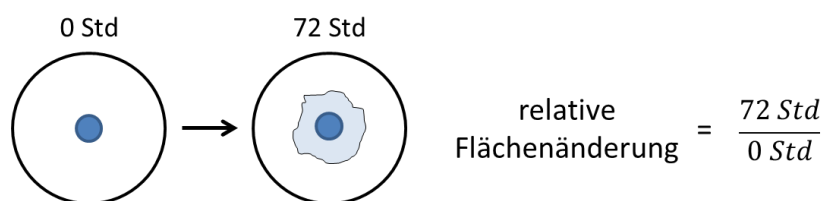
Komponente	Menge
25% Glutaraldehyd	1,6 ml
ddH <sub>2</sub> O	38,4 ml

#### 2.2.4.4.2 Migration auf unterschiedlichen Matrizes

Um die Zellen von einem zentrierten Punkt aus wandern lassen zu können wurden Sphäroide, wie in Abschnitt 2.2.1.4 3D-Zellkultur beschrieben, generiert. Jeweils ein Sphäroid wurde in 24- bzw. 96-Well-Platten (Greiner Bio-One) unterschiedlicher Beschichtung, transferiert. Die Platte waren mit vier verschiedenen Matrizes beschichtet: Poly-L-Lysin, für eine integrin-unabhängige Migrationskontrolle, sowie Kollagen Typ I, Fibronectin und Matrigel®, einer Laminin-reichen Matrix (210).

Die Matrigel®-Beschichtung wurde vor der Verwendung in die Wells einer Zellkulturplatte gegossen. Dafür wurde die Matrigel®-Stammlösung (Corning) auf Eis von einem gefrorenen in einen flüssigen Zustand überführt. 50 µl der flüssigen Stammlösung wurde in eine auf Eis gekühlte 24-Well Platte (Greiner Bio-One) überführt und durch Schwenken, auch an den Rändern der Wells, gleichmäßig verteilt. Das Matrigel® härtete 30 Min lang bei 37°C im Brutschrank (Thermo Scientific) aus. Nach dieser Inkubationszeit war die Platte einsatzbereit. Poly-L-Lysin (Greiner Bio-One) und Kollagen Typ I (Greiner Bio-One) wurden bereits vorbeschichtet in 24-Well Platten geliefert. Die Beschichtung mit Fibronectin (Greiner Bio-One) wurde in 96-Well Platten geliefert. Beide Plattentypen hatten eine ausreichend große Fläche, um die Migration der Sphäroide für einen Zeitraum von mindestens 72 Std zu analysieren.

24-Well-Patten wurden mit 500 µl, 96-Well Platten mit 100 µl Zellkulturmedium befüllt. Zuletzt wurde in jedes Well vorsichtig ein Sphäroid gegeben. Fotos wurden unmittelbar nach der Aussaat der Sphäroide, sowie nach 24, 48 und 72 Std gemacht. Diese wurden unter dem Mikroskop in 4x oder 2x Vergrößerung, aufgenommen. Der Durchmesser der Flächenausbreitung eines Sphäroids wurde mit Hilfe der Software ImageJ 1.8.0 (National Institutes of Health) berechnet. Die relative Flächenänderung wurde berechnet, indem der Quotient aus der Fläche nach 72 Std Ausbreitung und der Anfangsgröße des Sphäroids direkt nach der Aussaat gebildet wurde, wie in **Abbildung 39** schematisch zeigt.



**Abbildung 39** Schematische Darstellung der der Flächenausbreitung eines Sphäroids auf einer beschichteten Matrix.

### 2.2.5 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Rohdaten wurden mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation) aufgearbeitet und mit der Software GraphPad Prism 6/8 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (engl.: *standard deviation*, SD) dargestellt. Jedes Experiment wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten Student's T-Test durchgeführt. Der Einfluss verschiedener kategorialer unabhängiger Variablen auf eine kontinuierliche abhängige Variable wurde mit Hilfe der two-way-ANOVA analysiert. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines geeigneten Modells zur Untersuchung von Radioresistenz im HNSCC

Um die Mechanismen weiter aufzuklären, die im HNSCC zur Vermittlung von Radioresistenz führen, sollte zunächst ein geeignetes Modell etabliert werden.

##### 3.1.1 Verwendete HNSCC-Zelllinien

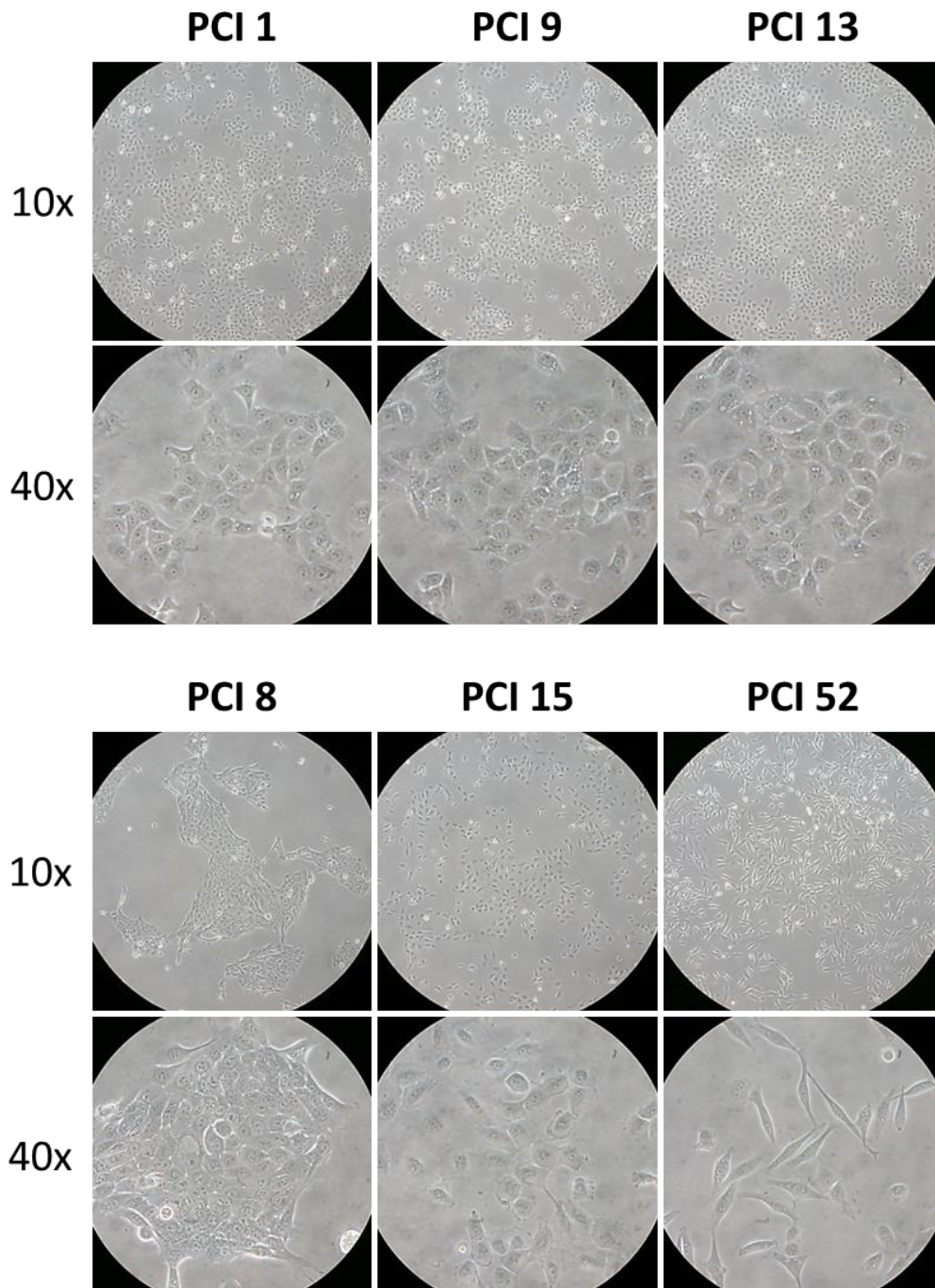
Es wurden Kopf-Hals-Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs näher charakterisiert. Um die Zelllinien in die zwei Kategorien - radiosensitiv (RS) und radioresistent (RR) - unterteilen zu können, wurden die Zelllinien zunächst auf ihre Radiosensitivität geprüft. Dafür wurden alle Zelllinien durch einen Linearbeschleuniger mit 12 Gy bestrahlt und deren Reaktion auf die Bestrahlung umfassend analysiert. Die Zellen wurden, wie in den nachfolgenden Experimenten gezeigt, auf morphologische Veränderungen, Stoffwechselaktivität, Verdopplungszeit und Apoptoserate nach der Bestrahlung untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden drei repräsentative RS und drei repräsentative RR Zelllinien für das Modell ausgewählt. Diese Zelllinien sind, mit näherer Beschreibung zu ihrem Ursprung, in **Tabelle 48** aufgelistet:

**Tabelle 48** Verwendete Zelllinien, unterteilt nach Radiosensitivität

	Zelllinie	anatomischer Ursprung	Tumorstatus
RS	PCI 1	Larynx	Primärtumor
	PCI 9	Zungengrund	Primärtumor
	PCI 13	retromolarer Bereich	Primärtumor
RR	PCI 8	Sinus pyriformis	Metastase
	PCI 15	Sinus pyriformis	Primärtumor
	PCI 52	Plica aryepiglottica	Primärtumor



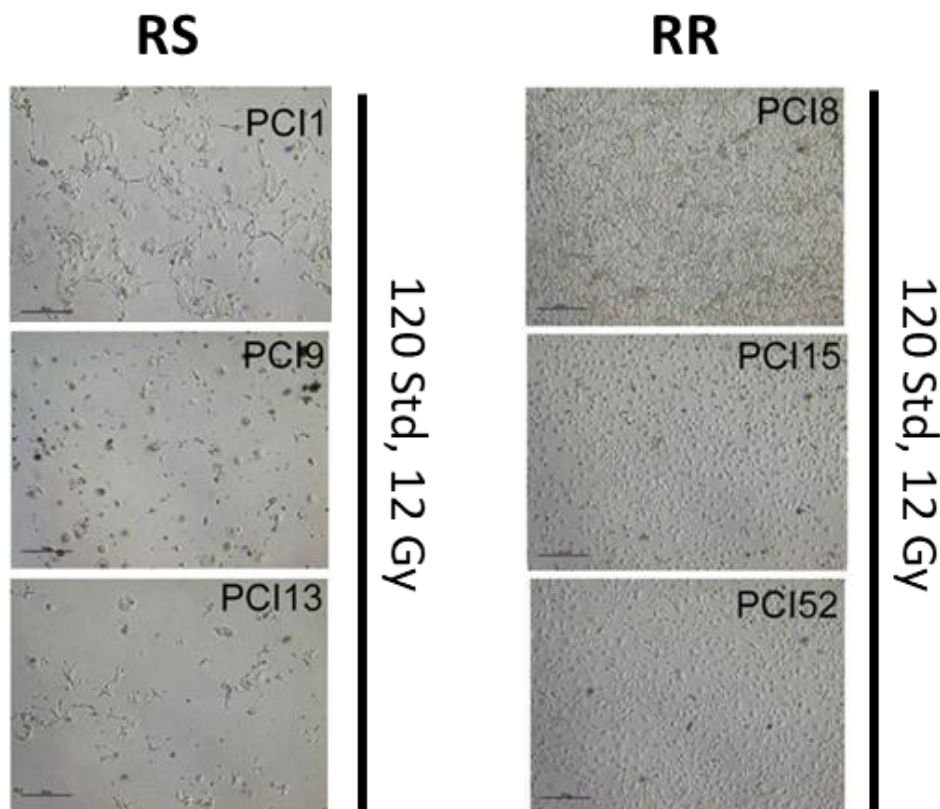
**Abbildung 40** zeigt mikroskopische Aufnahmen der RS Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und der RR Zelllinien PCI 8, PCI 15, PCI 52, in 10x und 40x Vergrößerung. Alle Zelllinien zeigten eine ausgeprägte epitheliale Morphologie und wuchsen als adhärenente Monoschicht. PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 8 wuchsen als eher scharf abgegrenzte, kompakte Zellinseln mit differenziertem Charakter. PCI 15 und PCI 52 wuchsen eher als diffuse, lose Zellaggregate mit undifferenzierterem Charakter.



**Abbildung 40** Mikroskopische Aufnahmen der HNSCC-Zelllinien PCI 1, 9, 13, 8, 15, und 52 in 10x und 40x Vergrößerung

### 3.1.2 Konfluenz nach Radiatio

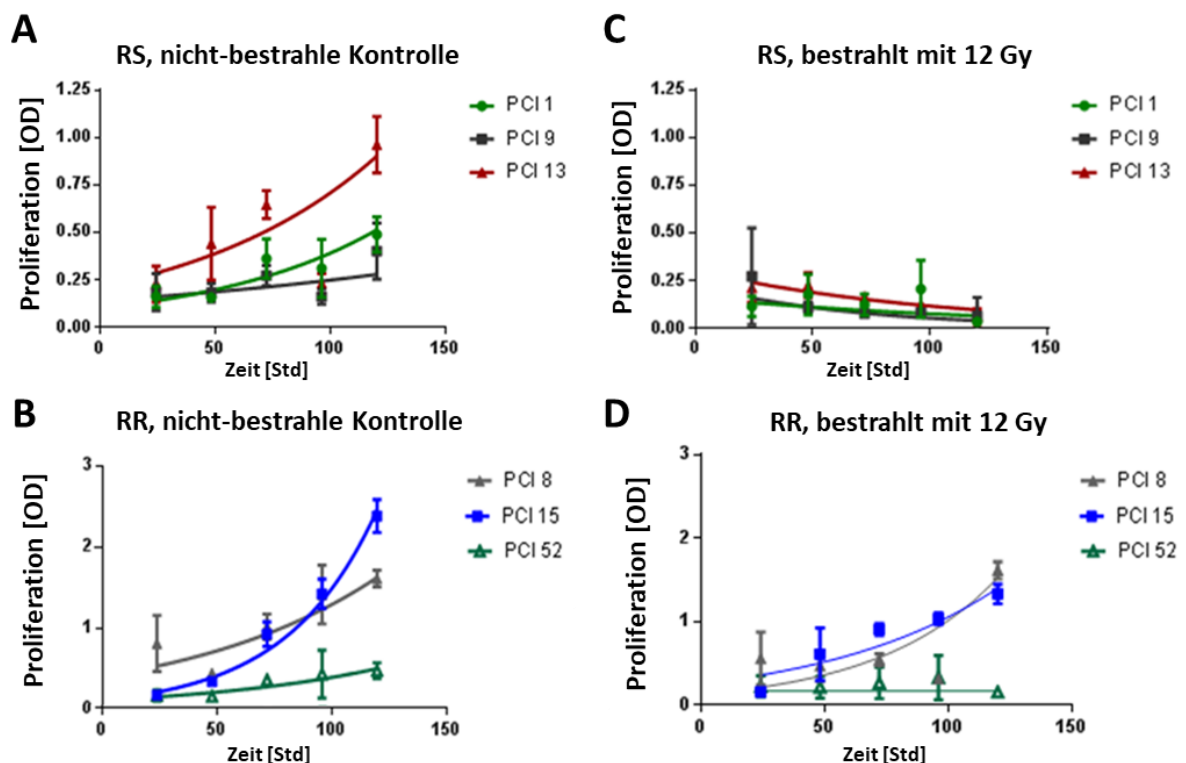
In **Abbildung 41** werden mikroskopische Aufnahmen von Zellen unterschiedlicher Radiosensitivität 120 Std nach der Bestrahlung mit 12 Gy dargestellt. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung hatten alle Zelllinien eine einheitliche Konfluenz von etwa 20 % (nicht gezeigt). Die nicht-bestrahlten Kontrollen erreichten an Tag 5 alle eine Konfluenz von 100 %. Abhängig von ihrer Radiosensitivität zeigten RS und RR Zelllinien fünf Tage nach der Bestrahlung auffällige Unterschiede bezüglich ihrer Konfluenz. In den RS Zelllinien leitete ein Großteil der Zellen infolge der Bestrahlung den Zelltod ein und löste sich vom adhärennten Zellverband ab. Die anfängliche Konfluenz von 20 % verringerte sich im Zeitverlauf. In den RR Zelllinien hingegen war trotz Bestrahlung eine deutliche Zunahme der Konfluenz zu beobachten.



**Abbildung 41** Mikroskopische Aufnahmen zeigen in 4x Vergrößerung die Konfluenzen von Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität, fünf Tage nach der Bestrahlung mit 12 Gy. Vor der Bestrahlung wurden identische Zellzahlen von  $5 \times 10^4$  Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Die Zellen adhärten über Nacht. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung hatten alle Zelllinien eine ähnliche Konfluenz von etwa 20 %. Fünf Tage nach der Bestrahlung zeigten die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 eine deutlich geringere Konfluenz, als die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15, PCI 52.

### 3.1.3 Vitalität nach Radiatio

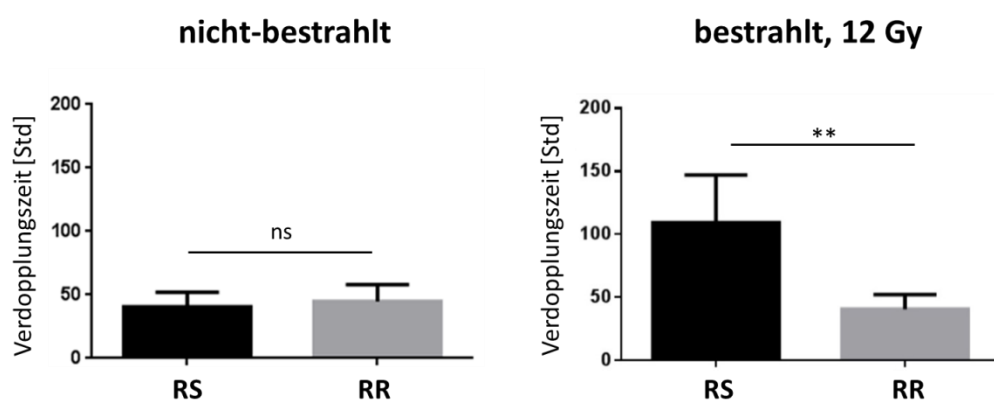
**Abbildung 42** zeigt die Vitalität der untersuchten HNSCC-Zelllinien mit und ohne Bestrahlung im zeitlichen Verlauf nach Durchführung eines WST-1 Proliferations-Assays. Die Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Stoffwechselaktivität wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen beobachtet. Unabhängig von ihrer Radiosensitivität, stieg bei nicht-bestrahlten RS (A) und RR (C) Zelllinien die Stoffwechselaktivität über den Zeitraum von fünf Tagen kontinuierlich an. Wurden die Zellen mit 12 Gy bestrahlt, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Vitalität, abhängig vom Grad ihrer Radiosensitivität. Die Stoffwechselaktivität der bestrahlten RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 (B) nahm innerhalb der untersuchten fünf Tage kontinuierlich ab. Die Stoffwechselaktivität der RR Zelllinien (D) PCI 8 und PCI 15 hingegen nahm trotz Bestrahlung über den Beobachtungszeitraum deutlich zu, oder konnte bei der langsamer proliferierenden Zelllinie PCI 52 zumindest aufrechterhalten werden.



**Abbildung 42** WST-1 Vitalitäts-Assay. Die Stoffwechselaktivität, korrelierend mit der Anzahl vitaler Zellen. Die OD wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Gemessen wurde 24, 48, 74, 96 und 120 Std, nach der Bestrahlung mit 12 Gy. A und B zeigen die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13. C und D zeigen die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52. Bei allen nicht-bestrahlten Zelllinien (A und C) zeigte ist bei stetig zunehmender Zellzahl auch eine kontinuierlich zunehmende Stoffwechselaktivität. Die bestrahlten RS Zelllinien (B) waren in ihrer Stoffwechselaktivität deutlich stärker beeinträchtigt als die RR Zelllinien (D).

### 3.1.4 Verdopplungszeit nach Radiatio

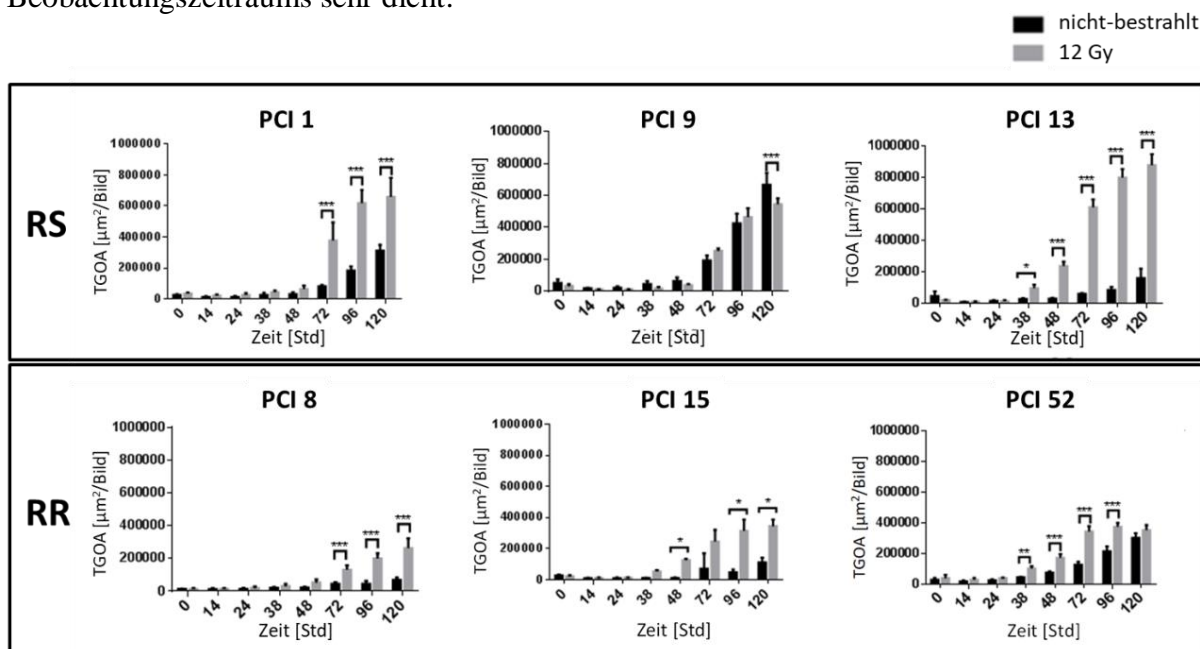
**Abbildung 43** zeigt den Einfluss von Bestrahlung auf die Verdopplungszeit der Zellen. Die Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Nicht-bestrahlte Zelllinien haben im Mittel eine Verdopplungszeit von etwa 48 Std. Nach der Bestrahlung mit 12 Gy benötigten die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit 104 Std signifikant länger für eine Verdopplung als die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, deren Verdopplungszeit sich nur geringfügig änderte.



**Abbildung 43** Verdopplungszeit von Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität, mit und ohne Bestrahlung, in Stunden [Std]. Die Verdopplungszeiten RS und RR Zelllinien waren ohne Bestrahlung ähnlich. Diese lag bei etwa 48 Std. Die mittlere Verdopplungszeit der RR Zelllinien blieb nach einer Bestrahlungsdosis von 12 Gy nahezu unverändert. Die RS Zelllinien hingegen benötigten mit 104 Std, etwa doppelt so lange für einen vollständigen Zellzyklus, nachdem sie bestrahlt wurden. N=3, Student's T-Test (ns = nicht signifikant, \*\* =  $p < 0,01$ ).

### 3.1.5 Apoptoserate nach Radiatio

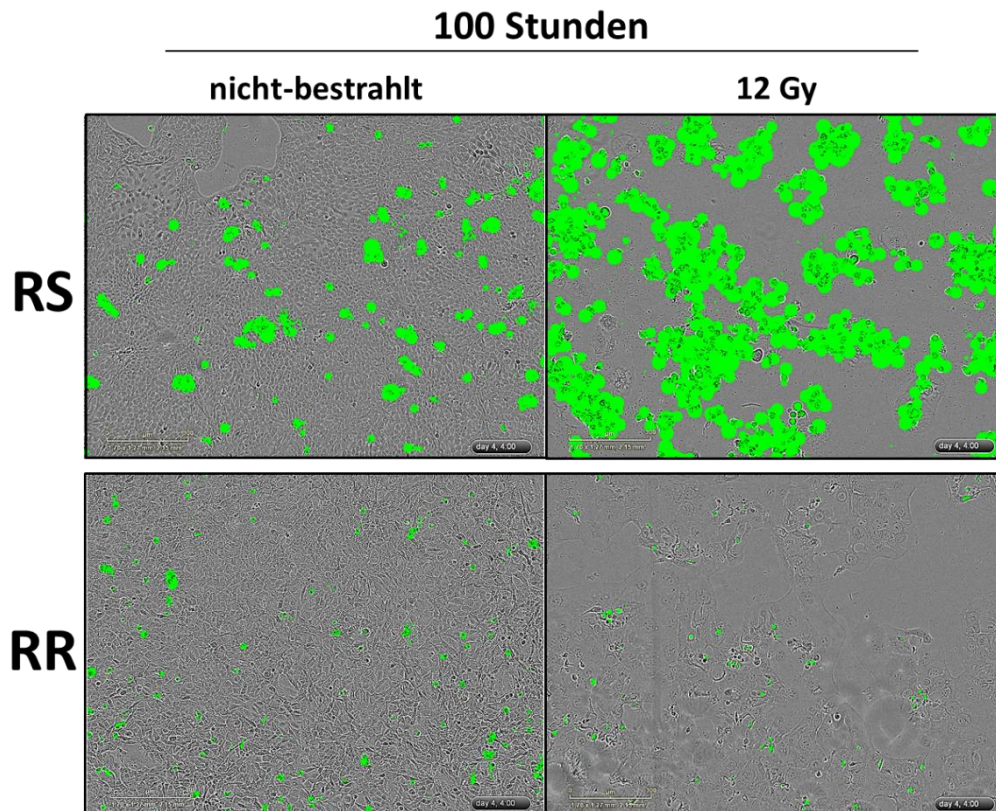
**Abbildung 44** zeigt die Ermittlung der Apoptoserate von Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität mittels *Live Cell Imaging*-Analyse. Die Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Es wurde die Fläche berechnet, die grün-fluoreszierende Objekte innerhalb der beobachteten Fläche (engl.: *total green object area*, TGOA) einnehmen. Apoptotische Zellen, bzw. Zellen mit verminderter Membranintegrität, führten hier eine Signalzunahme herbei. In den nicht-bestrahlten Kontrollen (schwarz) ließ sich bis zum 48 Std-Zeitpunkt kaum ein Signalanstieg, also kaum apoptotische Zellen nachweisen. Bestrahlte Zelllinien (grau) reagierten, abhängig von ihrem Grad der Radiosensitivität, unterschiedlich auf die Bestrahlung. RS Zelllinien begannen etwa 38 Std nach der Bestrahlung in einem großen Anteil der Zellen Apoptose zu induzieren. Die Induktion der Apoptose in den RR Zelllinien war deutlich geringer als in den RS Zelllinien. Ab dem 72 Std-Zeitpunkt ließ sich, abhängig von der Zelllinie, auch in den nicht-bestrahlten Zellen der Kontrollgruppe eine durch Konfluenz bedingte Zunahme der Apoptoserate nachweisen. Während die bestrahlten Zellen zu keinem Zeitpunkt vollständige Konfluenz erreichten, wuchsen die Kolonien der nicht-bestrahlten Kontrollen gegen Ende des Beobachtungszeitraums sehr dicht.



**Abbildung 44** Zytotoxizitäts-Assay mittels *Live Cell Imaging* nach der Bestrahlung von RS und RR Zelllinien mit 12 Gy. Die sogenannte total green object area, TGOA [ $\mu\text{m}^2/\text{Bild}$ ] beschreibt die Fläche, die grün-fluoreszierende Objekte innerhalb der beobachteten Fläche einnehmen. Nur Zellen mit verminderter Membranintegrität nehmen den fluoreszierenden Farbstoff YOYO-1 auf. Dort interkaliert YOYO-1 in doppelsträngige DNA, was ein detektierbares Fluoreszenz-Signal erzeugt. Auf diese Weise können tote Zellen detektiert und von vitalen Zellen diskriminiert werden. Schwarze Balken zeigen die nicht-bestrahlten Kontrollen. Graue Balken repräsentieren bestrahlte Zellen (12 Gy). Beobachtet wurde über einen Zeitraum von 120 Std. N=4, Two-Way ANOVA (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 45** zeigt repräsentative Bilder des *Live Cell Imaging* 100 Std nach der Bestrahlung mit 12 Gy. Die nicht-bestrahlten Kontrollen zeigten einen ähnlich niedrigen Anteil grün-fluoreszierender, apoptotischer Zellen bei sehr hoher Zelldichte. Die bestrahlte RS Zelllinie zeigte einen sehr hohen Anteil grün-fluoreszierender, apoptotischer Zellen bei geringer Zelldichte. Die bestrahlte RR Zelllinie zeigte einen sehr niedrigen Anteil grün-fluoreszierender, apoptotischer Zellen bei mittlerer Zelldichte.



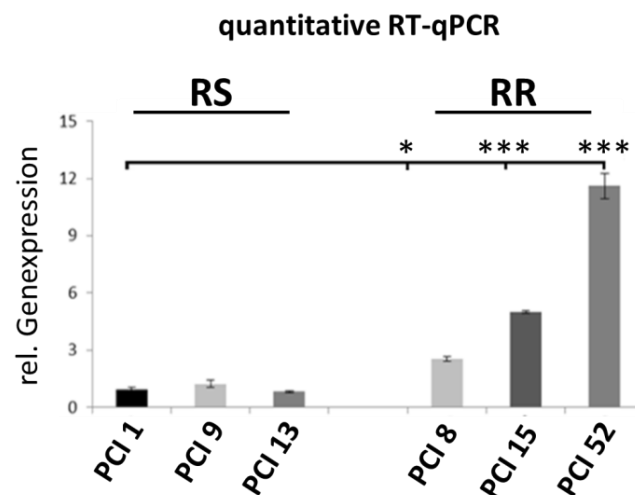
**Abbildung 45** Repräsentative Bilder des *Live Cell Imagings*. Von der repräsentativen RS Zelllinie PCI 13 und der RR Zelllinie PCI 15 wurden identische Zellzahlen in eine 96-Well Platte ausgesät. 24 Std nach der Aussaat wurden beide Zelllinien mit 12 Gy bestrahlt und mit nicht-bestrahlten Zellen verglichen. Zellen mit verminderter Membranintegrität erzeugten ein grün-fluoreszierendes, detektierbares Signal zur Bestimmung der Apoptoserate. Fotos wurden in 10x Vergrößerung zum 100 Std-Zeitpunkt im *Live Cell Imager* IncuCyte Zoom aufgenommen. Nach Bestrahlung zeigte die RS Zelllinie im Vergleich zur RR eine geringere Zelldichte mit höherem Anteil an apoptotischen Zellen.

## 3.2 PD-L1-Basalexpression von HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität

In den folgenden Experimenten wurde die Gen- und Proteinexpression von PD-L1 in den drei RS HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 und den drei RR HNSCC-Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 bestimmt.

### 3.2.1 PD-L1-Genexpression

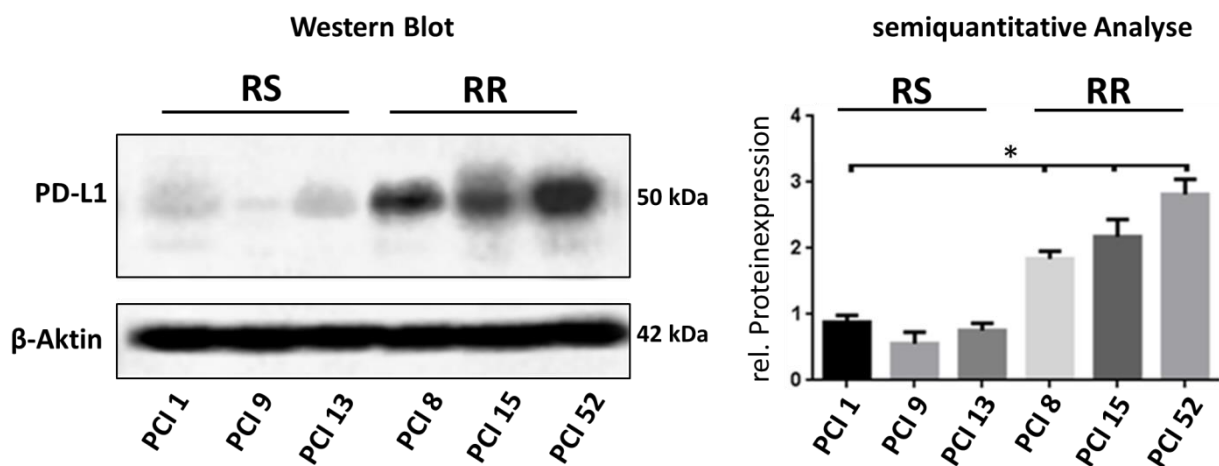
**Abbildung 46** zeigt die relative, basale Genexpression von CD274 (PD-L1) der verwendeten HNSCC-Zelllinien, mittels Taqman RT-qPCR. Alle untersuchten Zelllinien exprimierten CD274. Die Genexpression der RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 war signifikant höher als die der RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13. Alle drei RS Zelllinien wiesen eine ähnlich geringe Genexpression von PD-L1 auf. Unter den RR Zelllinien war PCI 8 die Zelllinie mit der geringsten PD-L1-Genexpression. Unter allen verwendeten Zelllinien wies PCI 8 eine intermediäre PD-L1-Genexpression auf. PCI 52 war von allen verwendeten Zelllinien die mit der höchsten PD-L1-Genexpression.



**Abbildung 46** Basalexpression von CD274 (PD-L1) in den drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 und den drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, ermittelt durch Taqman RT-qPCR. Die CD274 Expression wurde normalisiert auf das Housekeeping Gen 18S. Eingesetzt wurden 100 ng cDNA. Ct-Werte lagen für 18S bei  $11 \pm 0,578$  und für PD-L1 zwischen 28 und 34. PCI 1 diente als Referenzprobe. N=3, Student's T-Test (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p = < 0,001$ ).

### 3.2.2 PD-L1-Proteinexpression

**Abbildung 47** zeigt die relative, basale Proteinexpression von PD-L1 der verwendeten HNSCC-Zelllinien. Die repräsentativen Banden eines Western Blots (WB), sowie die semiquantitative Analyse zeigte in allen RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 eine signifikant höhere PD-L1-Basalexpression als in den RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13. Wie auch die Genexpression aufzeigte, war die basale Proteinexpression in allen RS Zelllinien ähnlich gering. Die Zelllinie PCI 8 war unter den RR Zelllinien die mit der geringsten PD-L1-Proteinexpression. Unter allen verwendeten Zelllinien wies PCI 8 eine intermediäre PD-L1-Proteinexpression auf. PCI 52 war von allen verwendeten Zelllinien die mit der höchsten PD-L1-Proteinexpression.

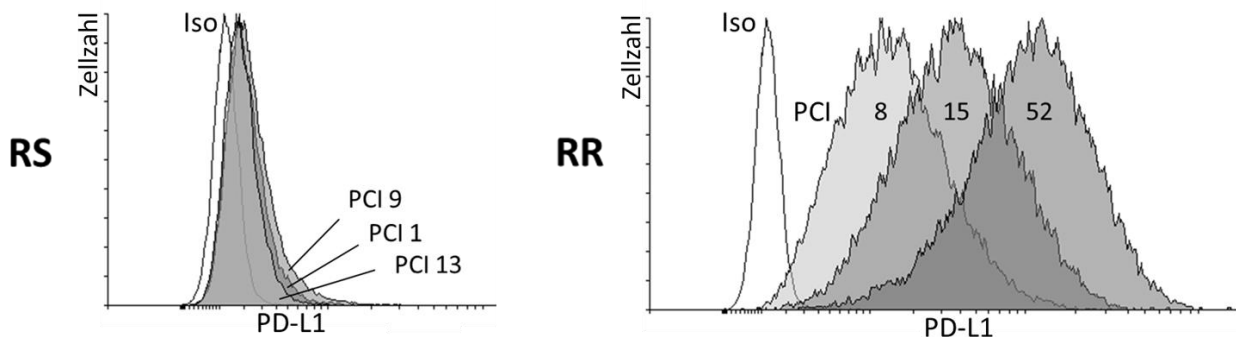


**Abbildung 47** Proteinexpression von PD-L1 in den RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 und den RR PCI 8, PCI 15 und PCI 52, ermittelt durch WB-Analyse. Der repräsentative Blot und die semiquantitative Analyse zeigen für die RR Zelllinien eine signifikant höhere PD-L1-Expression als für die RS Zelllinien. Die Zellen wurden 24 Std nach der Aussaat subkonfluent geerntet. Zur Normalisierung diente  $\beta$ -Aktin und als Referenzprobe PCI 1. N=3. Student's T-Test (\* =  $P < 0,001$ ).



### 3.2.3 PD-L1-Membranexpression

**Abbildung 48** zeigt die PD-L1-Basalexpression an der Membran von RS und RR Zelllinien nach einer durchflusszytometrischen (engl.: *fluorescence-activated cell scanning*, FACS)-Analyse. Diese zeigte deutliche Unterschiede zwischen den RS und RR Zelllinien. RS Zelllinien wiesen eine sehr geringe PD-L1-Basalexpression an ihrer Membran auf, die sich kaum von der Isotyp-Kontrolle (weiß) unterschied. An der Membran der RR Zelllinien hingegen konnte eine hohe PD-L1-Basalexpression nachgewiesen werden, die sich deutlich von der Isotyp-Kontrolle (weiß) und der Membranexpression der RS Zelllinien unterschied. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für das PE-Signal lag für die Isotyp-Kontrolle im Mittel bei 200 ( $\pm 63,7$ ). Für die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 lag die mittlere MFI des PE-Signals bei 355 ( $\pm 15,4$ ), 336 ( $\pm 3,1$ ) und 358 ( $\pm 6,7$ ). Die mittlere MFI des PE-Signals für die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 lag bei 713 ( $\pm 20,2$ ), 1928 ( $\pm 40,6$ ) und 8129 ( $\pm 137,1$ ). Die Membranexpressionen von PD-L1 der RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 waren somit ähnlich niedrig. PCI 8 zeigte die niedrigste Membranexpression unter den RR Zelllinien. PCI 52 zeigte von allen analysierten Zelllinien die höchste Expression.



**Abbildung 48** Eine durchflusszytometrische Analyse der Basalexpression von PD-L1 an der Membran ergab eine höhere Expression in allen RR Zelllinien im Vergleich zu den RS-Zelllinien. Die Histogramme zeigen die Zellzahl gegenüber der Signalstärke des PE-konjugierten anti-PD-L1 AK in logarithmischer Skalierung. Analysiert wurden lebende Zellen, die weder fixiert und noch permeabilisiert wurden. Gefärbt wurde mit einem spezifischen AK gegen natives, membranständiges PD-L1. Als Isotyp-Kontrolle (Iso, weiß) diente ein IgG2b-AK.

### 3.3 Einfluss der Radiatio auf HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität

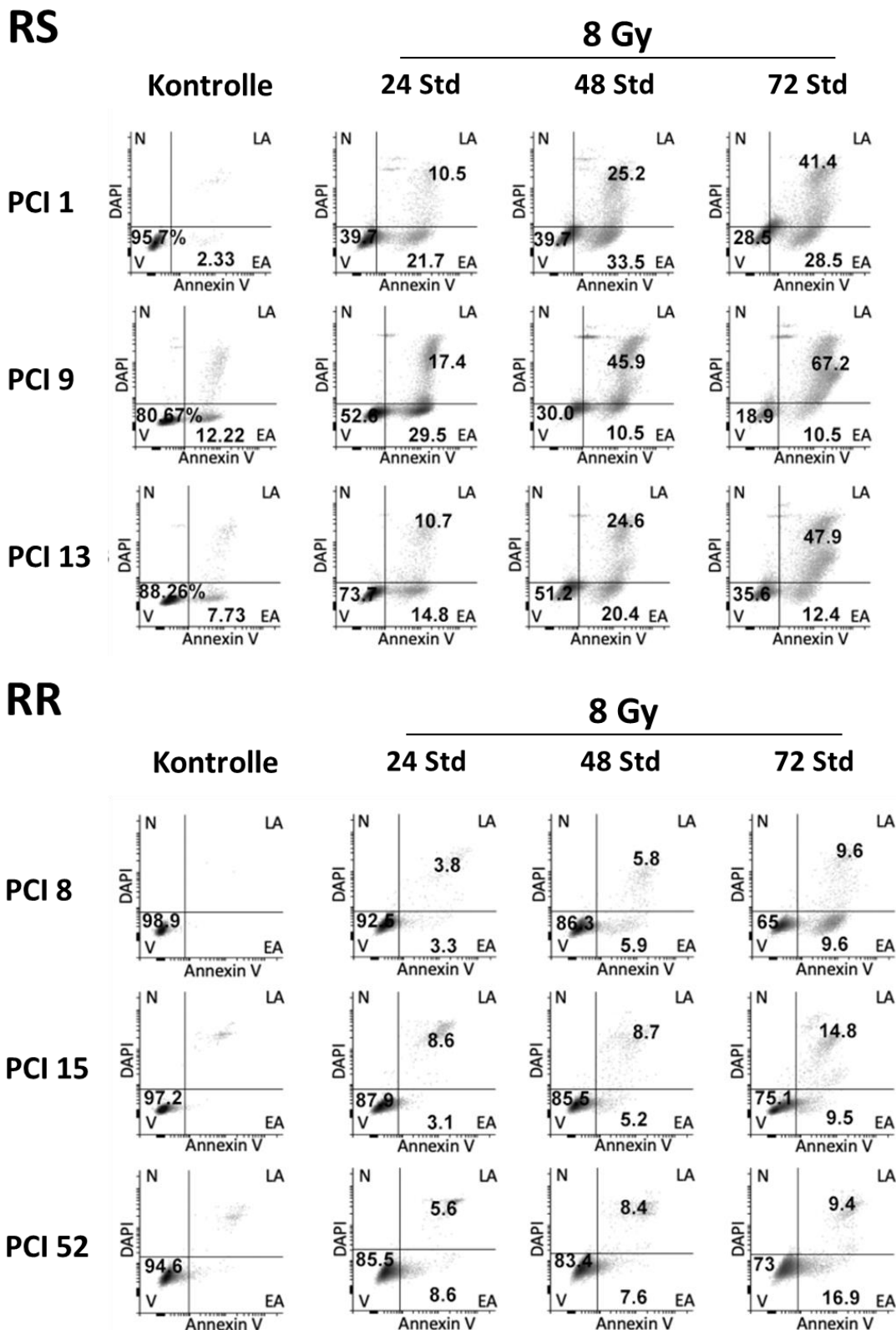
#### 3.3.1 Apoptoserate nach Radiatio

Die Bestimmung des Zelltods mittels FACS-Analyse erlaubt die zusätzliche Unterteilung der toten Zellen in früh- und spät-apoptotische, sowie nekrotische bzw. sehr spät-apoptotische Zellen. Für dieses Experiment wurden Zellen mit 8 Gy bestrahlt und 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienten als Kontrolle.

**Abbildung 49** zeigt das Ergebnis des FACS-Apoptose-Assays. Ohne Bestrahlung war der größte Anteil der RS und RR Zelllinien vital. Bei den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 lag der Anteil vitaler Zellen im Mittel bei 96,9 % ( $\pm 2,2$  %). Unter den nicht-bestrahlten RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 nahmen die vitalen Zellen im Mittel einen Anteil von 88,2 % ( $\pm 7,6$  %) ein.

Bereits 4 Std nach der Bestrahlung zeigte sich unter den RS Zelllinien eine rasche Induktion von Apoptose. 24 Std nach Bestrahlung wurde in den RS Zelllinien der Anteil vitaler Zellen im Mittel um 36,6 % ( $\pm 21,1$  %) verringert. 72 Std nach Bestrahlung induzierte der Großteil der RS Zelllinien frühe und späte Apoptose (75-80 %). Der Anteil früh- und spät-apoptotischer Zellen unter den RR Zelllinien war 72 Std nach Bestrahlung mit 19-26 % deutlich geringer.

Der Anteil nekrotischer Zellen ist nach der Bestrahlung mit einem mittleren Wert von 3,8 % ( $\pm 0,7$  %) bei den RS und RR Zelllinien vernachlässigbar gering.

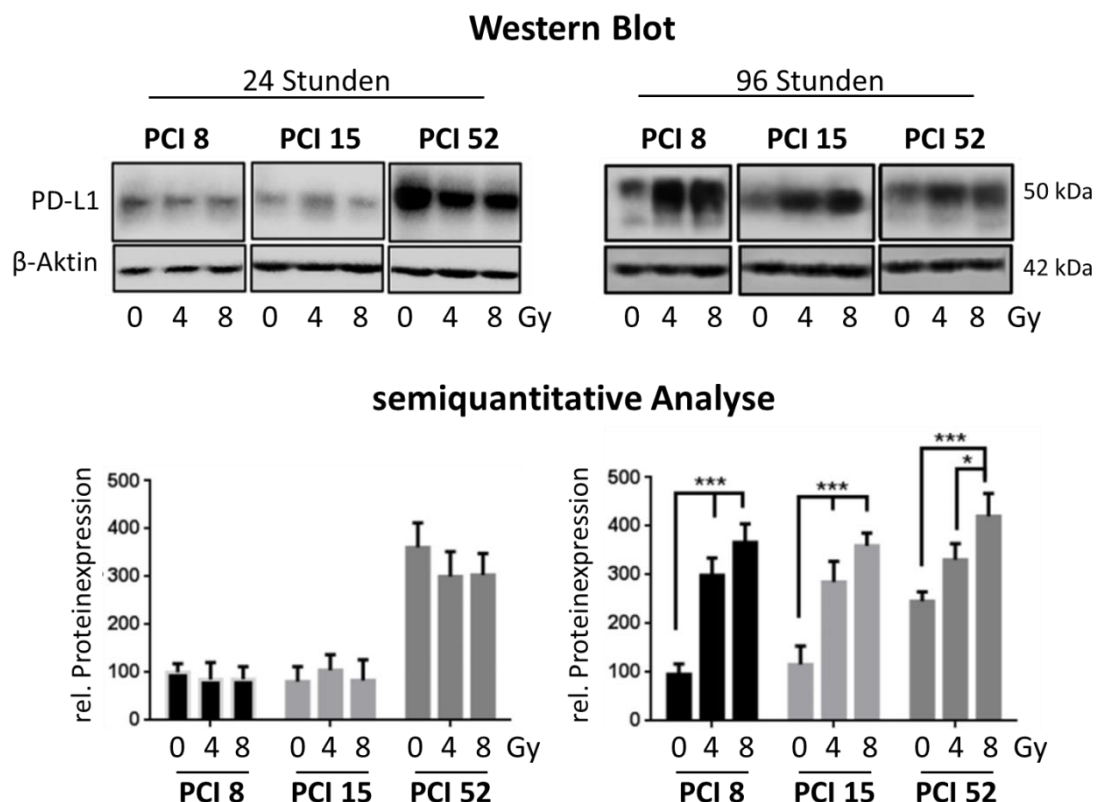


**Abbildung 49** FACS-Apoptose-Assay. RS (PCI 1, PCI 9, PCI 13) und RR Zelllinien (PCI 8, PCI 15, PCI 52) wurden mit 8 Gy bestrahlt und 24, 48, und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Eine DAPI-Annexin V-Doppelfärbung ermöglicht eine Unterteilung in vitale Zellen (V; linker, unterer Quadrant), früh-apoptotische Zellen (EA, engl.: *early apoptosis*; rechter, unterer Quadrant), spät-apoptotische Zellen (LA, engl.: *late apoptosis*; rechter, oberer Quadrant) und nekrotische Zellen (N, linker, oberer Quadrant). Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienen als Kontrolle. Der Anteil an der Gesamtpopulation wird in Prozent angegeben.

### 3.3.2 PD-L1-Expression in RR HNSCC-Zelllinien nach Radiatio

Die untersuchten RR HNSCC-Zelllinien zeichnen sich, im Vergleich zu den RS Zelllinien, durch eine hohe PD-L1-Expression aus. Weitere Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob und, wie sich die PD-L1-Expression nach der Bestrahlung ändert. Dafür wurden die RR Zelllinien mit zwei verschiedenen Bestrahlungsdosen von 4 und 8 Gy behandelt. 24 und 96 Std nach der Bestrahlung wurden die Zellen für eine WB-Analyse geerntet.

**Abbildung 50** zeigt repräsentative Banden und die semiquantitative Analyse des WB der drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression. Nach 24 Std waren noch keine signifikanten Änderungen der PD-L1-Expression infolge der Bestrahlung detektierbar. Die Zelllinien PCI 8 und PCI 15 zeigen in den nicht-bestrahlten Kontrollen nach 24 und 96 Std eine ähnliche PD-L1-Expression. Der PD-L1 Gehalt der nicht-bestrahlten Kontrolle der Zelllinie PCI 52 nimmt im Zeitverlauf leicht ab. 96 Std nach der Bestrahlung wurde in allen drei RR Zelllinien ein signifikanter Anstieg der PD-L1-Proteinexpression, abhängig von der Bestrahlungsdosis, beobachtet.

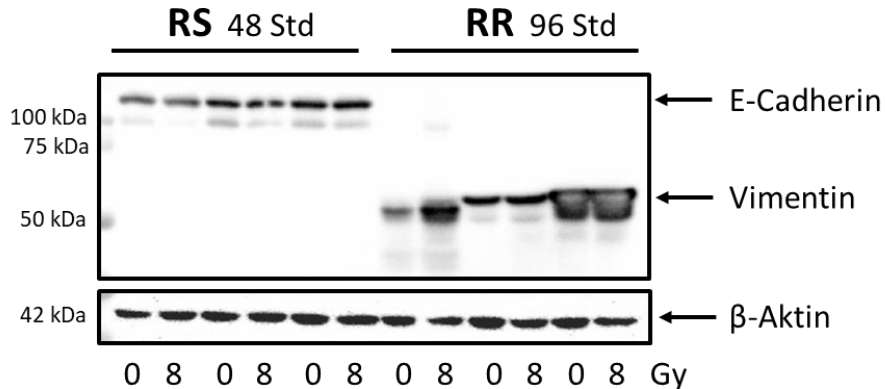


**Abbildung 50** Änderung der PD-L1-Proteinexpression in den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 Std nach der Aussaat mit zwei Bestrahlungsdosen von 4 und 8 Gy behandelt. Der PD-L1 Gehalt wurde zu einem frühen (24 Std) und einem späten (96 Std) Zeitpunkt nach der Bestrahlung bestimmt. Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienten als Kontrolle. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Gezeigt werden repräsentative Banden des WB und die semiquantitative Analyse. N=3. Two-way ANOVA (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.3.2.1 PD-L1-assoziierte EMT-Marker

PD-L1 wurde in neuesten Veröffentlichungen in Zusammenhang mit Fernmetastasierung gebracht. Um den Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und EMT in den hier verwendeten HNSCC-Zelllinien zu eruieren, wurden die Zelllinien näher charakterisiert. **Abbildung 51** zeigt die differenzielle Expression der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin in RS und RR HNSCC-Zelllinien. Die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 exprimierten den mesenchymalen Marker Vimentin, aber kein E-Cadherin. Die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 hingegen exprimierten den epithelialen Marker E-Cadherin aber kein Vimentin.

Um zu überprüfen, ob sich die Expression der EMT Marker durch die Bestrahlung ändert, wurden alle Zelllinien mit 8 Gy bestrahlt. RS Zelllinien wurden 48 Std, RR Zelllinien 96 Std nach der Bestrahlung geerntet. Nach Bestrahlung mit 8 Gy war die Vimentin-Expression in den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 erhöht. Auch eine leichte Zunahme in der E-Cadherin Expression war in Zelllinie PCI 8 zu beobachten. Die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 zeigten keine Änderung der Expression infolge der Bestrahlung.



**Abbildung 51** WB-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin in Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität. Die drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 zeigten eine starke E-Cadherin aber keine Vimentin-Expression. Die drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 zeigten eine Vimentin aber keine E-Cadherin-Expression. Nach der Bestrahlung mit 8 Gy nahm in den RR Zelllinien die Vimentin-Expression zu. Die Expression der RS Zelllinien blieb nach Bestrahlung unverändert. RS Zelllinien wurden 48 Std, RR Zelllinien 96 Std nach der Bestrahlung subkonfluent geerntet. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

### 3.3.3 Zelluläre Lokalisation von PD-L1 nach Radiatio

In den folgenden Experimenten sollte die genaue zelluläre Lokalisation von PD-L1 in RS und RR Zelllinien näher bestimmt werden. Die Membranexpression von PD-L1 vor und nach Bestrahlung wurde mittels FACS-Analyse, sowie einer WB-Analyse nach vorheriger Selektionierung der Membranfraktion durch Sulfo-NHS-SS-Biotin bestimmt. Die PD-L1-Expression in Kern und Zytoplasma wurde mittels WB-Analyse nach einer Auftrennung der Zellen in ihre unterschiedlichen Kompartimente bestimmt.

#### 3.3.3.1 PD-L1-Expression an der Membran

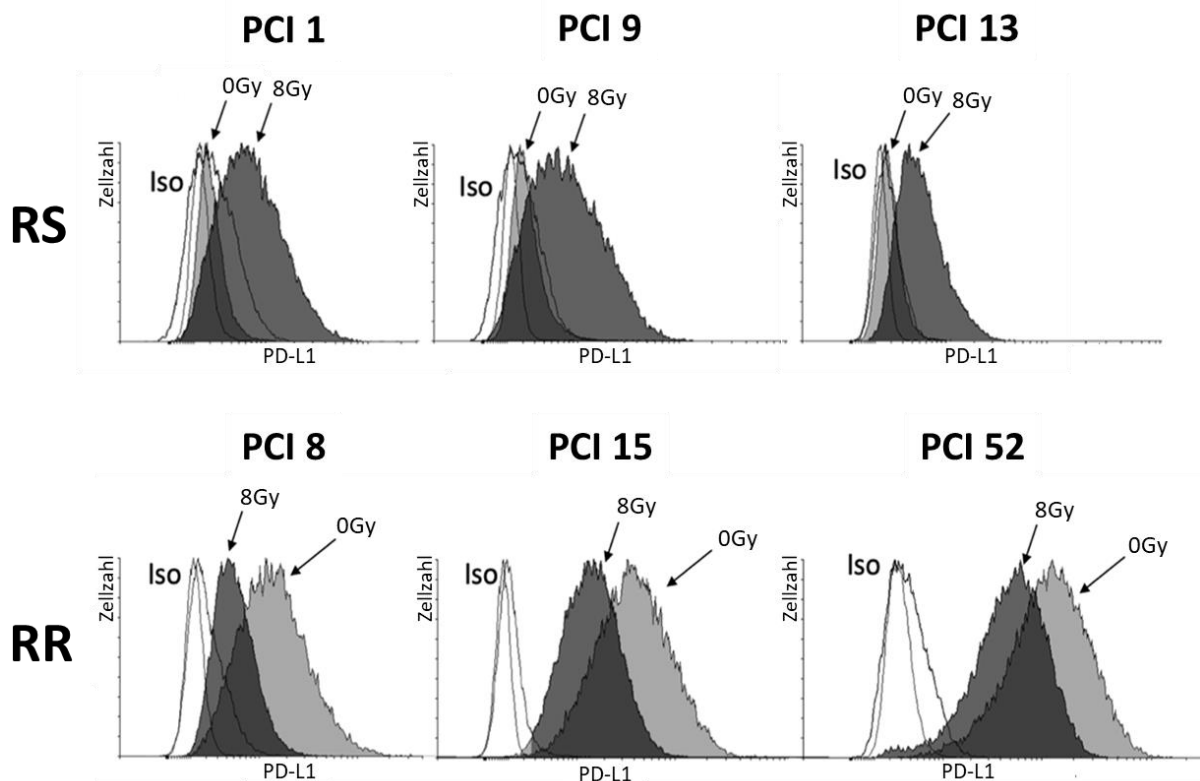
Sowohl die FACS-Analysen, als auch die WB-Analysen (nach vorheriger Selektionierung der Membranfraktion durch Sulfo-NHS-SS-Biotin) zeigten eine differenzielle PD-L1-Expression an der Membran von RS und RR Zelllinien, vor und nach Behandlung:

##### 3.3.3.1.1 Durchflusszytometrische-Analyse

Die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit niedriger PD-L1-Basalexpression an der Membran, sowie die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression an der Membran wurden mit 8 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle.

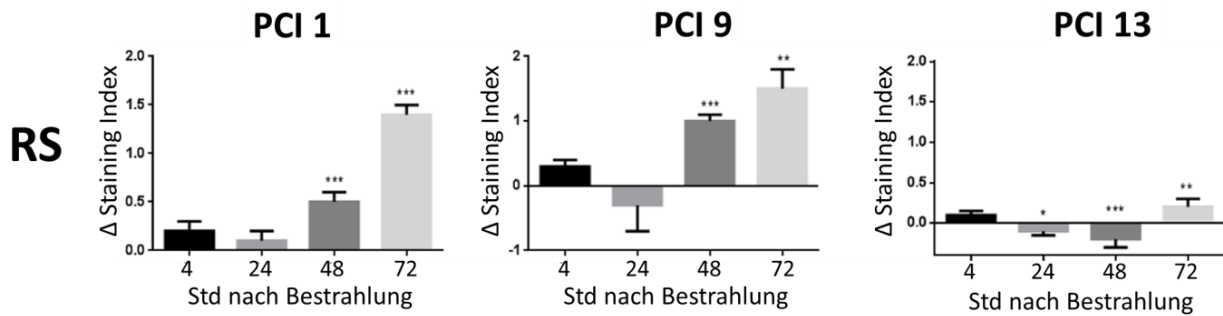
**Abbildung 52** zeigt die überlagerten Histogramme RS und RR Zelllinien 72 Std nach der Bestrahlung (8 Gy, dunkelgrau) zusammen mit der nicht-bestrahlten Kontrolle (0 Gy, hellgrau).

Nach der Bestrahlung mit 8 Gy änderte sich die Membranexpression in RS und RR Zelllinien auf gegensätzliche Weise. Bei den RS Zelllinien zeigte sich eine Signalzunahme infolge der Bestrahlung und somit eine Zunahme der PD-L1-Expression an der Membran. Die PD-L1-Expression an der Membran der RR Zelllinien hingegen nahm nach der Bestrahlung ab.



**Abbildung 52** Überlagerte Histogramme nach FACS-Analyse von Zellen unterschiedlicher Radiosensitivität. Die Histogramme zeigen die Änderung der PD-L1-Expression an der Membran 72 Std nach Bestrahlung (dunkelgrau, 8 Gy) im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (hellgrau, 0 Gy). Die Histogramme stellen die Zellzahl gegenüber der Signalstärke des PE-konjugierten anti-PD-L1 AK in logarithmischer Skalierung dar. Analysiert wurden lebende Zellen, die weder fixiert, noch permeabilisiert wurden. Gefärbt wurde mit einem spezifischen anti-PD-L1-AK, der ausschließlich an natives, membranständiges PD-L1 bindet. Als Isotyp-Kontrolle (Iso, weiß) diente ein IgG2b-AK. RS Zelllinien induzierten 72 Std nach der Bestrahlung die PD-L1-Expression an ihrer Membran, RR Zelllinien hingegen verringerten die Expression.

72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy zeigte sich in den Isotyp-Kontrollen eine leichte Signalzunahme, was eine Zunahme an unspezifischen Bindungen durch die Behandlung impliziert. Um aufgrund von falsch-positiven Signalen keine falschen Schlussfolgerungen über die Signalzunahme an der Membran RS Zelllinien nach der Bestrahlung zu ziehen, wurden die Änderungen der Signalstärke infolge der Bestrahlung normalisiert und quantifiziert. Hierfür wurde der sogenannte *Staining Index* (SI) berechnet. **Abbildung 53** zeigt für jede RS Zelllinie ein Diagramm das den errechneten delta ( $\Delta$ ) SI darstellt, also die Änderung der PD-L1-Expression an der Membran 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung. Durch die Berechnung des  $\Delta$  SI wurde bewiesen, dass alle untersuchten RS Zelllinien ihre PD-L1-Expression bereits 48 Std (PCI 1 und PCI 9), beziehungsweise 72 Std (PCI 13) nach der Bestrahlung signifikant an der Membran erhöhten.

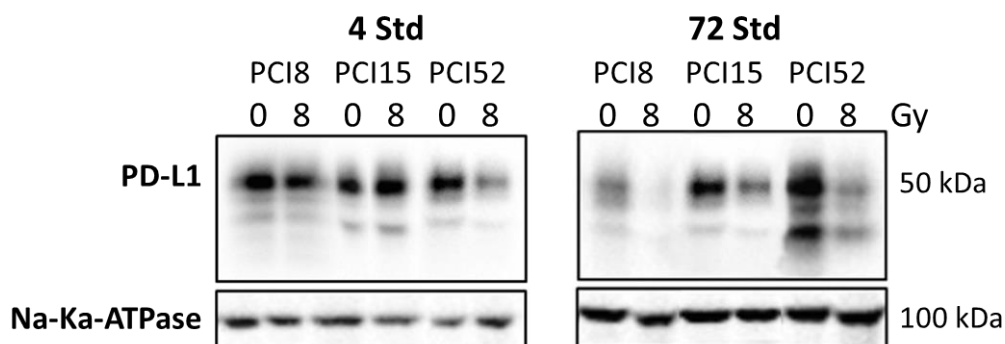


**Abbildung 53** Delta ( $\Delta$ ) Staining Index (SI) 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Hierfür wurde zunächst der SI berechnet, um falsch-positive Signale unspezifischer Bindungen zu normalisieren. Um die Änderung der PD-L1-Expression an der Membran zu jedem Zeitpunkt zu ermitteln wurde im Anschluss der  $\Delta$  SI berechnet. Für jeden Zeitpunkt wurde vom SI der bestrahlten Zellen der SI der nicht-bestrahlten Kontrolle subtrahiert. RS Zelllinien induzieren ihre Expression an der Membran nach der Bestrahlung signifikant. N=3, Two-Way ANOVA (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

### 3.3.3.1.2 WB-Analyse nach Membran-Selektionierung durch Sulfo-NHS-SS-Biotin

Um die Verringerung der PD-L1-Expression an der Membran der RR Zelllinien infolge der Bestrahlung mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde die PD-L1-Expression in der Membranfraktion zu einem frühen (4 Std) und einem späten Zeitpunkt (72 Std) nach der Bestrahlung mittels WB-Analyse detektiert. **Abbildung 54** zeigt repräsentative Blots.

4 Std nach Bestrahlung zeigte sich nur bei der Zelllinie PCI 52 bereits eine nachweisbare Änderung der PD-L1-Membranexpression. 72 Std nach der Bestrahlung zeigten alle RR Zelllinien eine deutliche Verringerung der PD-L1-Expression an ihrer Membran.



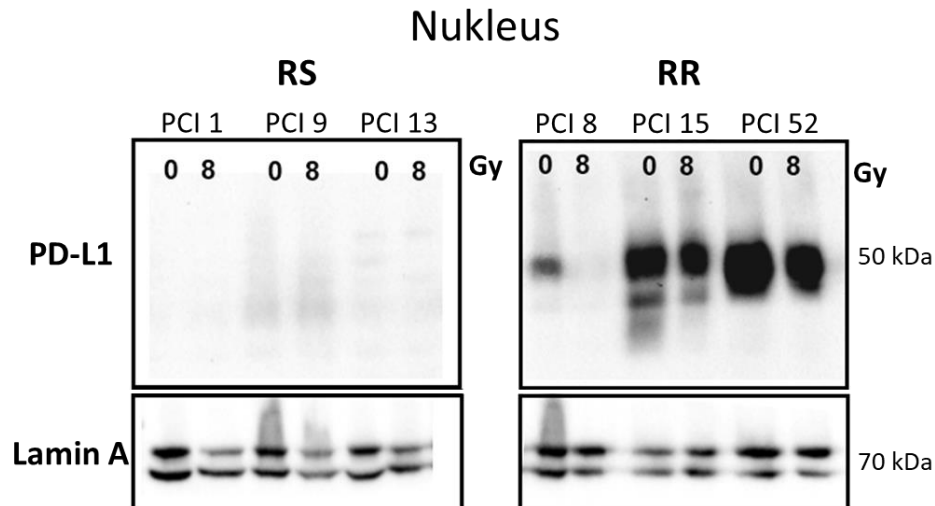
**Abbildung 54** Repräsentativer Blot der Membranfraktion RR Zelllinien. RR Zelllinien wurden mit 8 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle (0 Gy). 4 und 72 Std nach der Bestrahlung wurde die PD-L1-Membranexpression bestimmt. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurden die Membranen der Zellen mit Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert, an magnetische Beads gebunden und von den restlichen Zellkompartimenten getrennt. Na-K-ATPase diente als Ladekontrolle.



### 3.3.3.2 PD-L1-Expression in Kern und Zytoplasma

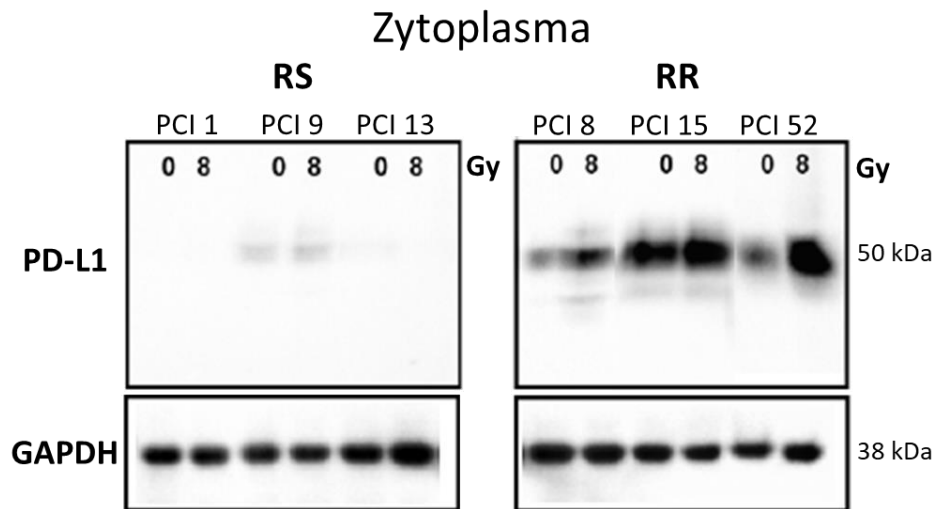
Um weiter aufzuklären, wo PD-L1 in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität genau in der Zelle lokalisiert ist, wurden die RS und RR Zelllinien mit Hilfe des *ProteoExtract Subcellular Extraction Kit* (Merck) in ihre verschiedenen Zellkompartimente Membran, Zytoplasma und Kern aufgetrennt. Mit diesem Experiment sollte auch überprüft werden, ob und wie sich die PD-L1-Expression nach der Bestrahlung in den jeweiligen Kompartimenten ändert. Alle Zelllinien wurden mit 8 Gy bestrahlt und 48 Std nach der Bestrahlung geerntet. Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienten als Kontrolle.

**Abbildung 55** zeigt die PD-L1-Expression im Nukleus. Die PD-L1-Kernexpression von RR Zelllinien unterschied sich signifikant von der PD-L1-Kernexpression der RS Zelllinien. Ausschließlich in RR Zelllinien war eine Detektion von PD-L1 im Nukleus nachweisbar. 48 Std nach der Bestrahlung nahm die PD-L1-Expression im Nukleus der RR Zelllinien ab. Dennoch blieb ein Teil der Expression im Nukleus der RR Zelllinien erhalten. Die PD-L1-Expression im Nukleus der RS Zelllinien änderte sich nach der Bestrahlung nicht nachweislich.



**Abbildung 55** WB-Analyse nach Isolierung der Kernfraktion der drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 (links) und drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 (rechts). Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle (0 Gy). 48 Std nach der Bestrahlung wurde die Kernfraktion der Zellen isoliert. Lamin A diente als Ladekontrolle.

**Abbildung 56** zeigt die PD-L1-Expression im Zytoplasma von RS und RR Zelllinien. Bei gleicher Belichtungsdauer zeigte sich eine deutlich höhere PD-L1-Expression im Zytoplasma von RR Zelllinien im Vergleich zu den RS Zelllinien. 48 Std nach der Bestrahlung nahm die PD-L1-Expression im Zytoplasma der RR Zelllinien weiter zu. Die PD-L1-Expression im Zytoplasma der RS Zelllinien änderte sich nach der Bestrahlung nicht.

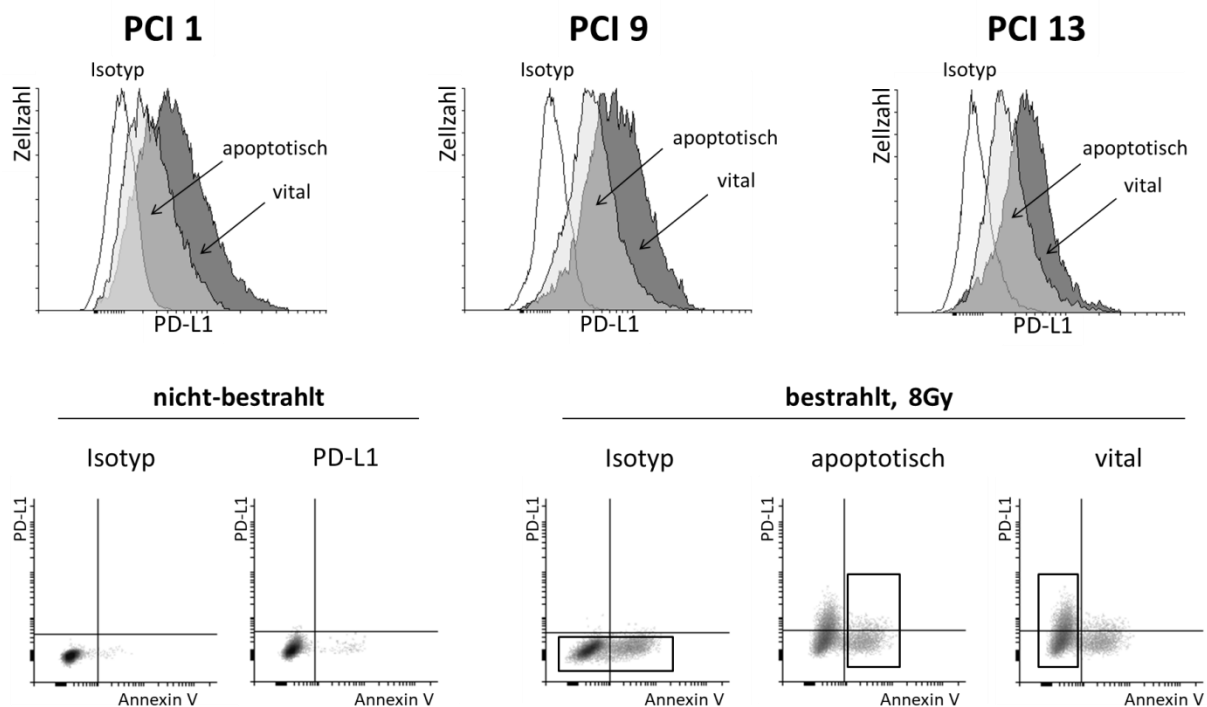


**Abbildung 56** WB-Analyse nach Isolierung der Zytoplasmafraktion der drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 (links) und der drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 (rechts). Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt., nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. 48 Std nach der Bestrahlung wurde die Zytoplasmafraktion isoliert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

### 3.3.3.3 Einfluss der PD-L1-Lokalisation auf das Überleben nach Radiatio

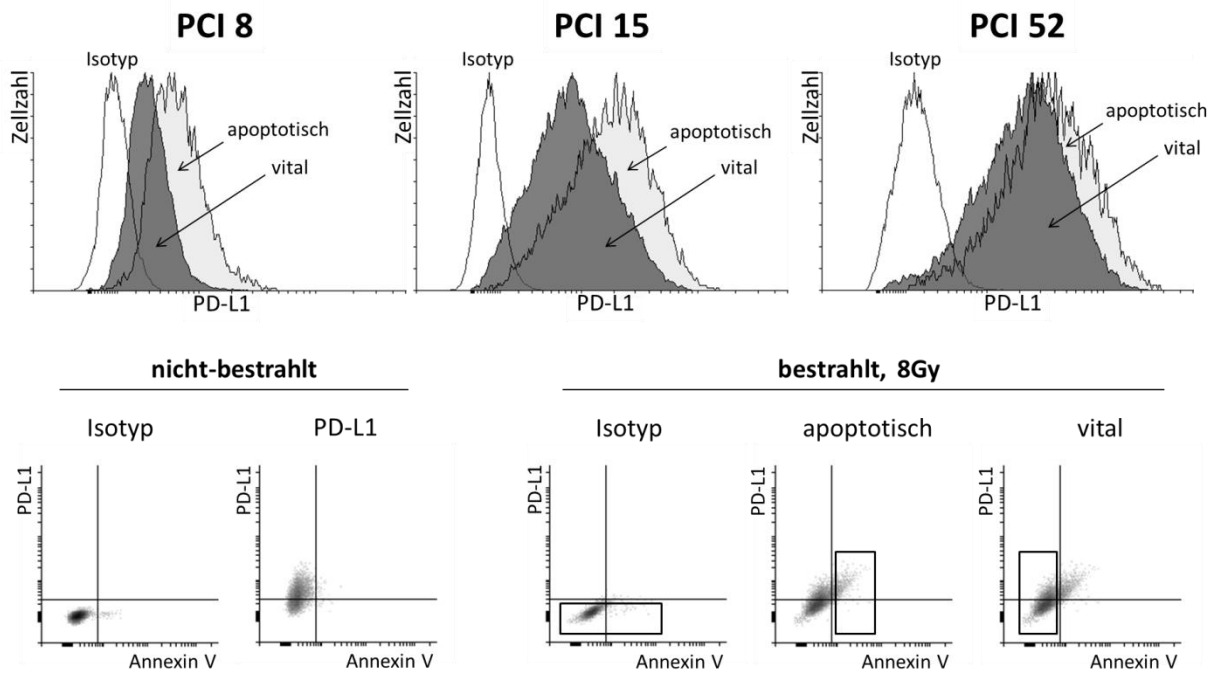
Die Ergebnisse des FACS-Apoptose-Assays in Kapitel 3.3.1 zeigten, dass in den RS Zelllinien 72 Std nach Bestrahlung, trotz der generell starken Induktion von Apoptose, 20-25 % der Zellpopulation noch vital war. In den RR Zelllinien lag der Anteil vitaler Zellen 72 Std nach der Bestrahlung bei 75-80 %. Eine Annexin V-PD-L1-Doppelfärbung ermöglichte in einer weiteren FACS-Analyse die Auftrennung der Gesamtpopulation in eine vitale und eine apoptotische Subpopulation. Diese Subpopulationen wurden auf ihre PD-L1-Expression an ihrer Zellmembran untersucht.

**Abbildung 57** zeigt die überlagerten Histogramme der RS Zelllinien 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy. In den RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 zeigte die vitale Subpopulation 72 Std nach der Bestrahlung ein deutlich stärkeres Signal für PD-L1, also eine Induktion der PD-L1-Expression an der Membran, im Vergleich zur apoptotischen Subpopulation.



**Abbildung 57** Überlagerte Darstellung von Histogrammen einer Annexin V-PD-L1-Doppelfärbung der RS-HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 nach einer FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Inkubiert wurde mit einem PE-konjugierten anti-PD-L1-AK, der ausschließlich natives, membranständiges PD-L1 detektiert. Eine Kontrollfärbung mit einem IgG2bκ-Isotyp wurde mitgeführt. Alle Zellen wurden zusätzlich mit dem Apoptosemarker Annexin V mit APC-Konjugat gefärbt, um eine Unterteilung in vitale (dunkelgrau) und apoptotische Subpopulationen (hellgrau) zu ermöglichen. Dotplots der Zelllinie PCI 1 veranschaulichen repräsentativ für die RS-Gruppe das *Gating* zur Erstellung der Histogramme. APC- und PE-Signale wurden in logarithmischer Skalierung dargestellt.

**Abbildung 58** zeigt die überlagerten Histogramme der RR Zelllinien 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy. In den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 zeigte sich ein gegensätzlicher Effekt zu den RS Zelllinien. Unter den RR Zelllinien wurde in der vitalen Subpopulation 72 Std nach der Bestrahlung ein deutlich geringeres Signal detektiert als in der apoptotischen Subpopulation. Die vitalen RR Zellen zeigten damit eine deutlich geringere PD-L1-Expression an der Membran.

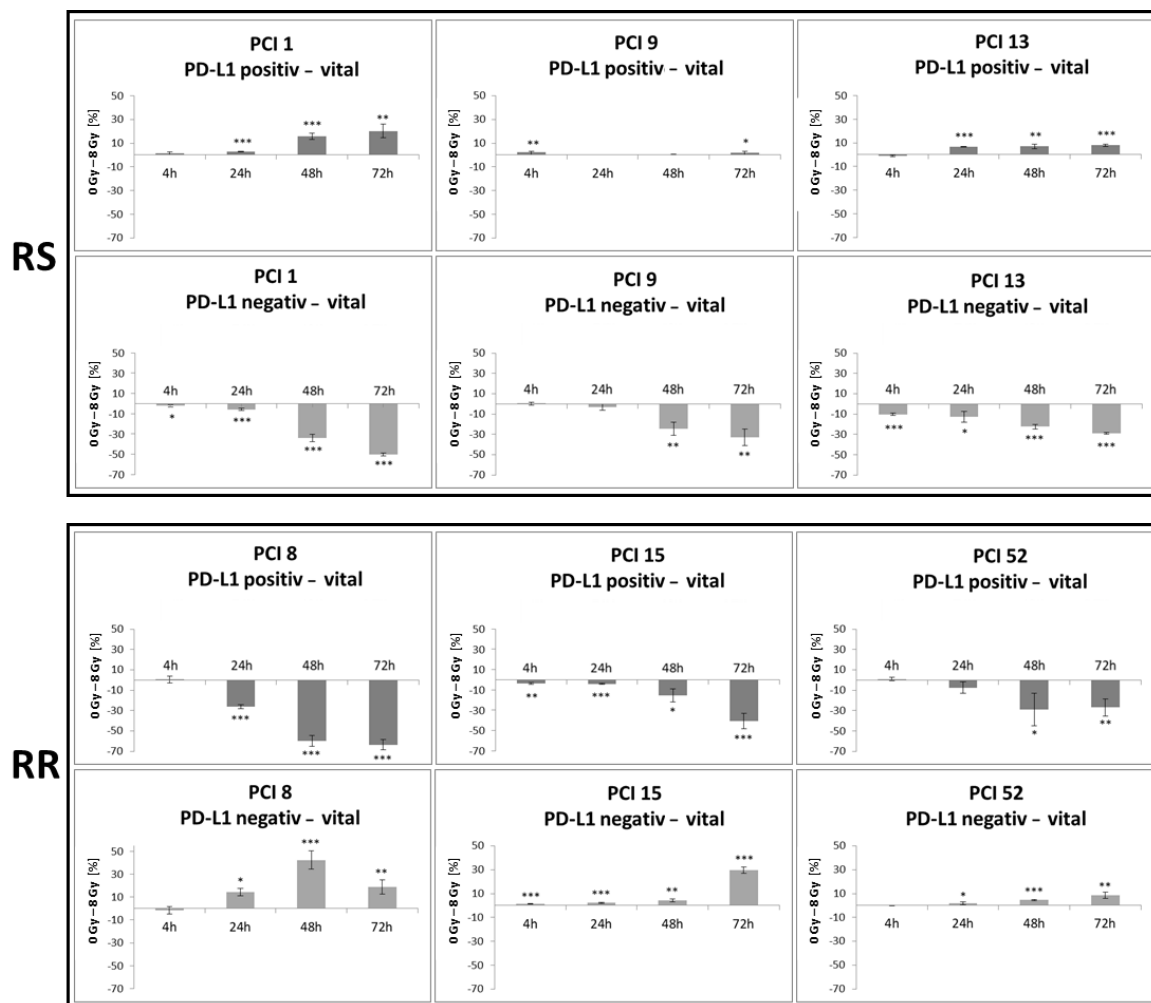


**Abbildung 58** Überlagerte Darstellung von Histogrammen einer Annexin V-PD-L1-Doppelfärbung der RR-HNSCC-Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 nach einer FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Inkubiert wurde mit einem PE-konjugierten anti-PD-L1-AK, der ausschließlich natives, membranständiges PD-L1 detektierte. Eine Kontrollfärbung mit einem IgG2 $\kappa$ -Isotyp wurde mitgeführt. Alle Zellen wurden zusätzlich mit dem Apoptosemarker Annexin V mit APC-Konjugat gefärbt, um eine Unterteilung in vitale (dunkelgrau) und apoptotische Subpopulationen (hellgrau) zu ermöglichen. Dotplots der Zelllinie PCI 8 veranschaulichen repräsentativ für die RR-Gruppe das *Gating* zur Erstellung der Histogramme. APC- und PE-Signale wurden in logarithmischer Skalierung dargestellt.

Für dieses Experiment wurden die Zellen neben dem 72-Std-Zeitpunkt auch 4, 24, und 48 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy analysiert, um auch den zeitlichen Verlauf der Expressionsänderung von PD-L1 an der Membran darstellen zu können. **Abbildung 59** zeigt die Änderung des Anteils an PD-L1-positiven und negativen Zellen in den Zellpopulationen von RS und RR Zelllinien. Hierfür wurde die Differenz die aus bestrahlten (8 Gy) und nicht-bestrahlten Zellen (0 Gy) berechnet.

In den drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 erhöhte sich in der vitalen Subpopulation nach der Bestrahlung der Anteil an Zellen, die eine positive PD-L1-Membranexpression aufwiesen. Der Anteil an vitalen Zellen mit negativer PD-L1-Membranexpression nahm hingegen im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ab.

In den drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Der Anteil an Zellen, die eine positive PD-L1-Membranexpression aufwiesen, nahm in der vitalen Subpopulation im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung kontinuierlich ab. Der Anteil an Zellen mit negativer PD-L1-Expression an der Membran nahm hingegen zu.

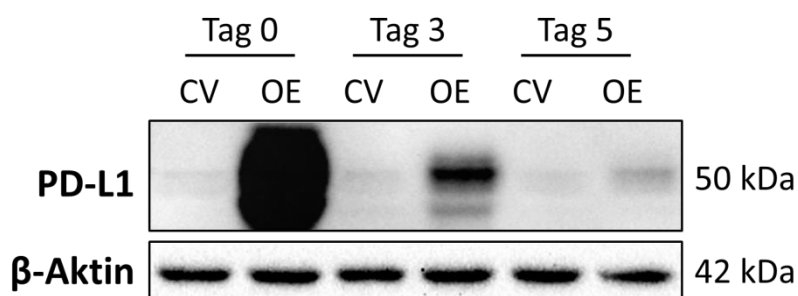


**Abbildung 59** Änderung des Anteils an PD-L1-positiven und negativen Subpopulationen nach der Bestrahlung in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität. Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt und 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung analysiert. Nicht-bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Ernte wurden die Zellen mit dem APC-konjugierten Apoptosemarker Annexin V und einem PE-konjugierten anti-PD-L1-AK inkubiert, der ausschließlich natives, membranständiges PD-L1 detektierte. Damit wurde eine Unterteilung in vitale und apoptotische Zellpopulationen möglich, sowie eine zusätzliche Diskriminierung zwischen PD-L1-negativen und -positiven Subpopulationen. Für die Berechnung des Anteils PD-L1-Expimierender, vitaler Zellen wurde der Anteil nicht-bestrahlter Zellen vom Anteil bestrahlter Zellen subtrahiert und mit der Ausgangssituation verglichen (nicht-bestrahlte Kontrolle der ersten Messung nach Bestrahlung). N=3, Student's T-Test (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.4 Zellintrinsische Funktionen von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien

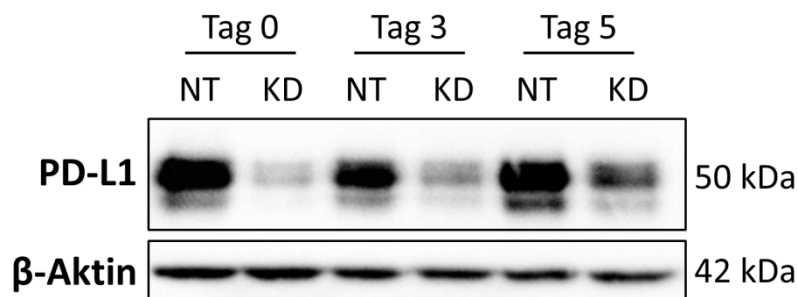
Zur Ermittlung der Funktion von PD-L1 in den verwendeten RS und RR HNSCC-Zelllinien wurde der PD-L1 Gehalt der Zelllinien durch Transfektion manipuliert. Im Anschluss wurden funktionelle Assays durchgeführt. Der PD-L1 Gehalt wurde in den schwach PD-L1-Expimierenden RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 durch Plasmid-Transfektion induziert (OE). In den PD-L1 RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, welche PD-L1 intermediär und stark exprimierten, wurde die PD-L1-Expression durch siRNA-Transfektion verringert (KD). Bei beiden Transfektionen handelte es sich um transiente Transfektionen, deren Effekte nur von begrenzter Dauer sind. Daher wurde für alle Zelllinien geprüft, ob der Einfluss auf die PD-L1-Expression über die gesamte Dauer des Experiments, d.h. über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen, anhielt.

**Abbildung 60** repräsentierte in der RS Zelllinie PCI 1 die Haltbarkeit der PD-L1 OE. Transfiziert wurde ein Leervektor (CV) oder ein Plasmid mit integrierter PD-L1-Sequenz. Die PD-L1-Expression wurde direkt nach der Transfektion, also zum theoretischen Experimentstart (Tag 0), analysiert sowie drei und fünf Tage danach. Die PD-L1-Expression der mit CV transfizierten Zellen änderte sich im zeitlichen Verlauf nicht. Die mit PD-L1-Plasmid transfizierten Zellen exprimierten zu allen analysierten Zeitpunkten mehr PD-L1 als die mit CV transfizierten Zellen. Die PD-L1 OE zeigte zum ersten Messzeitpunkt (Tag 0) die höchste PD-L1-Expression. Dieser Effekt nahm im Zeitverlauf ab. Trotzdem war drei und fünf Tage nach der Transfektion, in den mit PD-L1-Plasmid transfizierten Zellen die PD-L1-Expression noch deutlich höher ausgeprägt als in den mit CV transfizierten Zellen.



**Abbildung 60** Repräsentativer Blot der RS Zelllinie PCI 1 zur Ermittlung der Haltbarkeit der PD-L1 OE durch Plasmid-Transfektion. Transfiziert wurde mit Leervektor (CV) oder mit einem Plasmid mit integrierter PD L1-Sequenz (OE). Zellen wurden direkt nach Ablauf der Transfektion analysiert, also zum theoretischen Experimentstart (Tag 0), sowie drei und fünf Tage danach. β-Aktin diente als Ladekontrolle. N=3.

**Abbildung 61** zeigt die Haltbarkeit der PD-L1-Expression nach der siRNA-Transfektion der repräsentativen RR Zelllinie PCI 52. Transfiziert wurde NT siRNA oder PD-L1 siRNA, die zur Verringerung der PD-L1-Expression führte. Die PD-L1-Expression wurde direkt nach der Transfektion, also zum theoretischen Experimentstart (Tag 0) analysiert, sowie drei und fünf Tage danach. Die PD-L1-Expression der mit NT siRNA transfizierten Zellen änderte sich im zeitlichen Verlauf nicht. Die mit PD-L1 siRNA transfizierten Zellen (KD) zeigten zu allen analysierten Zeitpunkten eine geringere PD-L1-Expression als die mit NT siRNA transfizierten Zellen. Der PD-L1 KD zeigte zum ersten Messzeitpunkt (Tag 0) die geringste PD-L1-Expression. Dieser Effekt nahm im Zeitverlauf ab. Trotzdem war drei und fünf Tage nach der Transfektion in den mit PD-L1 siRNA transfizierten Zellen die PD-L1-Expression noch deutlich geringer als in den mit NT siRNA transfizierten Zellen.

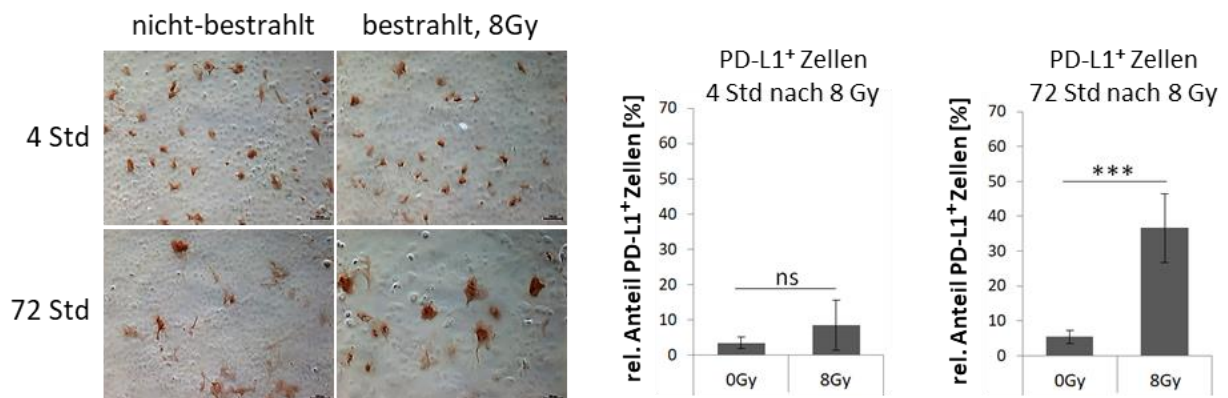


**Abbildung 61** Repräsentativer WB der RR Zelllinie PCI 52 zur Ermittlung Haltbarkeit des PD-L1 KD durch siRNA-Transfektion. Transfiziert wurde mit NT siRNA oder PD-L1 siRNA (KD). Zellen wurden direkt nach Ablauf der Transfektion analysiert, also zum theoretischen Experimentstart (Tag 0), sowie drei und fünf Tage danach. Detektiert wurde PD-L1. β-Aktin diente als Ladekontrolle. N=3.

### 3.4.1 Einfluss von PD-L1 auf das Überleben der RS Zelllinien nach Radiatio

Um zu überprüfen, ob PD-L1 das Überleben in HNSCC-Zelllinien nach der Bestrahlung begünstigt, wurde in den RS Zelllinien mit geringer PD-L1-Basalexpression die PD-L1-Expression durch transiente Plasmid-Transfektion induziert.

Zu einem frühen (4 Std) und späten Zeitpunkt (72 Std) nach der Bestrahlung mit 8 Gy wurde der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen evaluiert. **Abbildung 62** zeigt anhand der repräsentativen Zelllinie PCI 9 wie 10-15 % der RS Tumorzellen eine sehr starke PD-L1-Expression induzierten. Vier Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich noch keine signifikante Änderung am Anteil der PD-L1-positiven Zellen in der nicht-bestrahlten Kontrolle (4 % ± 2 %) und den bestrahlten Zellen (8,8 % ± 2 %). 72 Std nach der Bestrahlung war die Zahl der adhärennten Zellen im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle deutlich geringer. Der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen (36,6 % ± 9,8 %) war in den bestrahlten Zellen im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (5,4 % ± 2 %) allerdings signifikant höher.

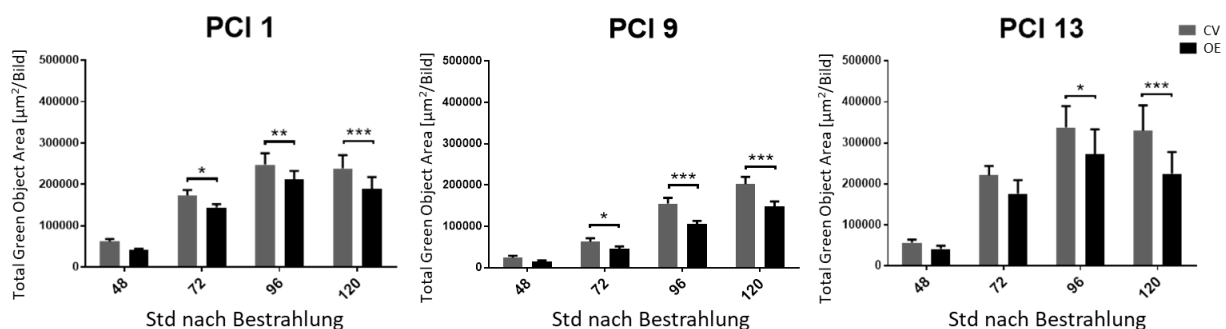


**Abbildung 62** Anteil PD-L1-positiver Zellen der repräsentativen RS Zelllinie PCI 9. Die PD-L1-Expression wurde mittels transientser Plasmid Transfektion induziert. Vier und 72 Std nach Bestrahlung mit 8 Gy wurde der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent [%] berechnet. PD-L1-positive Zellen wurden mittels DAB-Färbung detektiert (braun). Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt (nicht gezeigt). 72 Std nach der Bestrahlung zeigte die PD-L1 induzierte RS Zelllinie einen signifikant erhöhten relativen Anteil an PD-L1-positiven Zellen in der überlebenden Population. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit 4x Vergrößerung aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte mit dem Programm ImageJ. N=3, Student's T-Test (ns = nicht signifikant; \*\*\* p= < 0,001).



**Abbildung 63** zeigt das Ergebnis einer *Live Cell Imaging*-Analyse zur Bestimmung des PD-L1-abhängigen Anteils apoptotischer Zellen nach Bestrahlung. Analysiert wurden die drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit geringer PD-L1-Basalexpression. Auch hier wurde die PD-L1-Expression durch transiente Plasmid-Transfektion induziert, um zu zeigen, ob PD-L1 das Überleben in HNSCC-Zellen nach der Bestrahlung begünstigt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 120 Std beobachtet.

Die Analyse der Apoptoserate mittels *Live Cell Imaging* zeigte, dass Zellen in denen die PD-L1-Expression mittels Plasmid-Transfektion induziert wurde (OE) nach der Bestrahlung mit 8 Gy signifikant weniger Apoptose induzierten, als Zellen, die mit einem Leervektor (CV) transfiziert wurden. Eine Signifikanz zeigte sich ab dem 72 Std Messzeitpunkt nach der Bestrahlung. Dieser Effekt nahm bis zur letzten Messung, 120 Std nach der Bestrahlung in allen untersuchten Zelllinien zu.

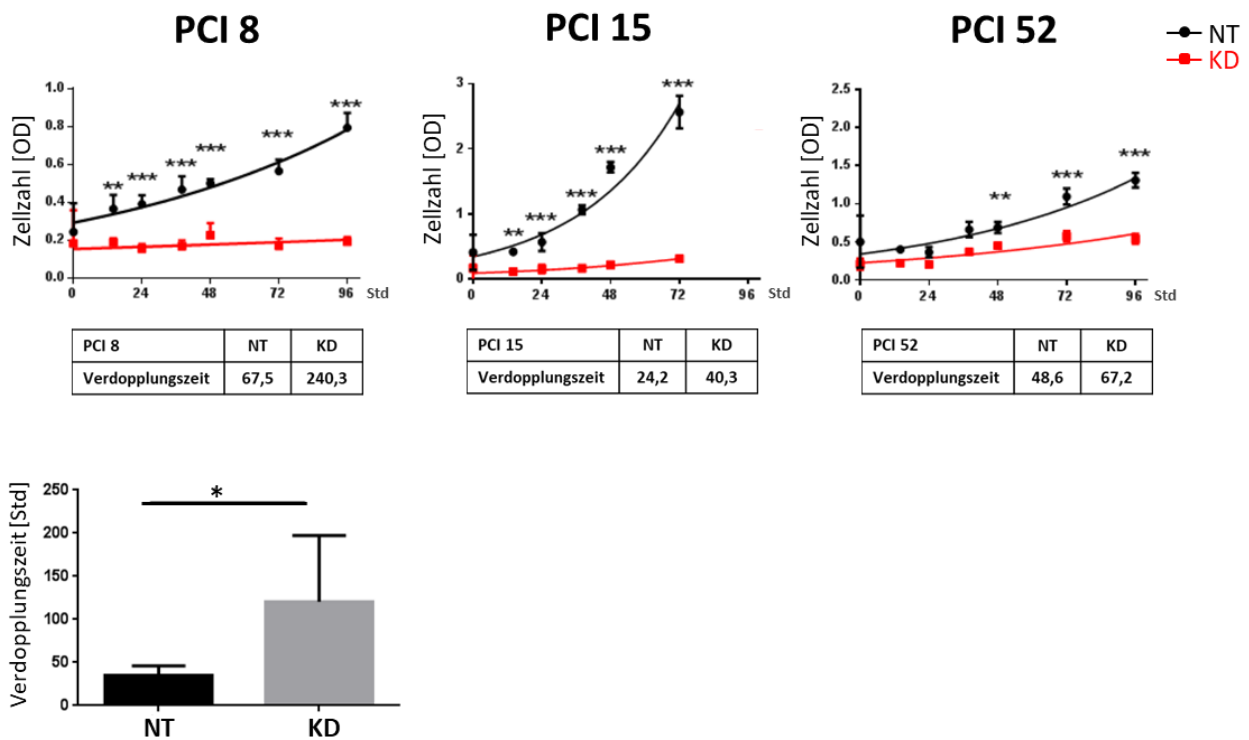


**Abbildung 63** Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels *Live Cell Imaging*, nach Bestrahlung der RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13. PD-L1 Die Expression wurde mittels transients Plasmid Transfektion induziert. Die total green object area, TGOA [ $\mu\text{m}^2/\text{Bild}$ ] beschreibt den Anteil grün-fluoreszierender Objekte innerhalb der beobachteten Fläche 48, 72, 96 und 120 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Nur Zellen mit verminderter Membranintegrität nehmen den fluoreszierenden Farbstoff YOYO-1 auf. Auf diese Weise können apoptotische Zellen detektiert und von vitalen Zellen diskriminiert werden. Schwarze Balken repräsentieren Zellen, in denen die PD-L1-Expression mittels Plasmid-Transfektion überexprimiert wurde (OE). Graue Balken repräsentieren die Transfektion mit Leervektor (CV). Zellen, in denen die PD-L1-Expression induziert wurde, zeigten eine signifikant geringere Apoptoserate ab dem 72 Std Messzeitpunkt nach der Bestrahlung, als die Kontrollen. N=4, Two-Way ANOVA (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p = < 0,001$ ).

### 3.4.2 Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die Expression von PD-L1 in den RR HNSCC-Zelllinien eine entscheidende Rolle für die Proliferation spielt, wurde der PD-L1 Gehalt in diesen Zelllinien mittels siRNA-Knockdown herunterreguliert und ein WST-1 Proliferations-Assay durchgeführt. Die transfizierten Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 96 Std beobachtet.

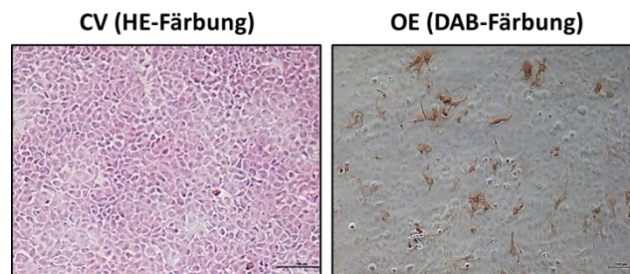
**Abbildung 64** zeigt die drei untersuchten RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression. In allen Zelllinien zeigte sich eine signifikant geringere Zellzahl nach dem PD-L1-Knockdown (KD) im Vergleich zur Kontrolle (NT). Im Mittel stieg die Verdopplungszeit nach dem PD-L1-Knockdown von 46,8 Std auf 115,9 Std an. Die Begünstigung der Proliferation durch die Expression von PD-L1 in den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 war strahlungsunabhängig (Daten bestrahlter Zellen nicht gezeigt).



**Abbildung 64** Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52. Der WST-1 Proliferations-Assay zeigt in Rot Zellen der Kontrollgruppe, die mit Non-Targeting siRNA (NT) transfiziert wurden und in Schwarz Zellen, deren PD-L1 Gehalt durch Transfektion mit PD-L1 siRNA (KD) verringert wurde. Durch Senkung der PD-L1-Expression verringerte sich auch die Proliferationsrate signifikant. N=4, Two-way ANOVA (\*\*= p < 0,01;\*\*\* = p < 0,001). Die Verdopplungszeit der RR Zelllinien nach PD-L1 siRNA-Knockdown war verglichen mit der NT siRNA Kontrolle signifikant verlangsamt. N=3, Student's T-Test (\*= p < 0,05).

### 3.4.3 Einfluss von PD-L1 auf Migration und Invasion

Immunzytochemische-Färbungen von PD-L1 mit DAB zeigten nach der Überexpression von PD-L1 in RS Zelllinien keine einheitliche PD-L1-Expression. Stattdessen waren nur vereinzelte Zellen der Population sehr stark PD-L1-positiv. Erkennbar war dies an der deutlichen Braunfärbung. Genau diese Zellen zeigten auch eine stark veränderte Morphologie. Zellen mit stark positiver PD-L1-Expression hatten eine langgestreckte, spindelförmige Gestalt. **Abbildung 65** zeigt repräsentative Bilder der RS HNSCC-Zelllinie PCI 9 mit niedriger PD-L1-Basalexpression nach der Plasmid-Transfektion. Als Transfektionskontrolle wurden Zellen mit Leervektor transfiziert (CV) und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Diese Zellen zeigten einheitlich eine typisch rundliche Morphologie.

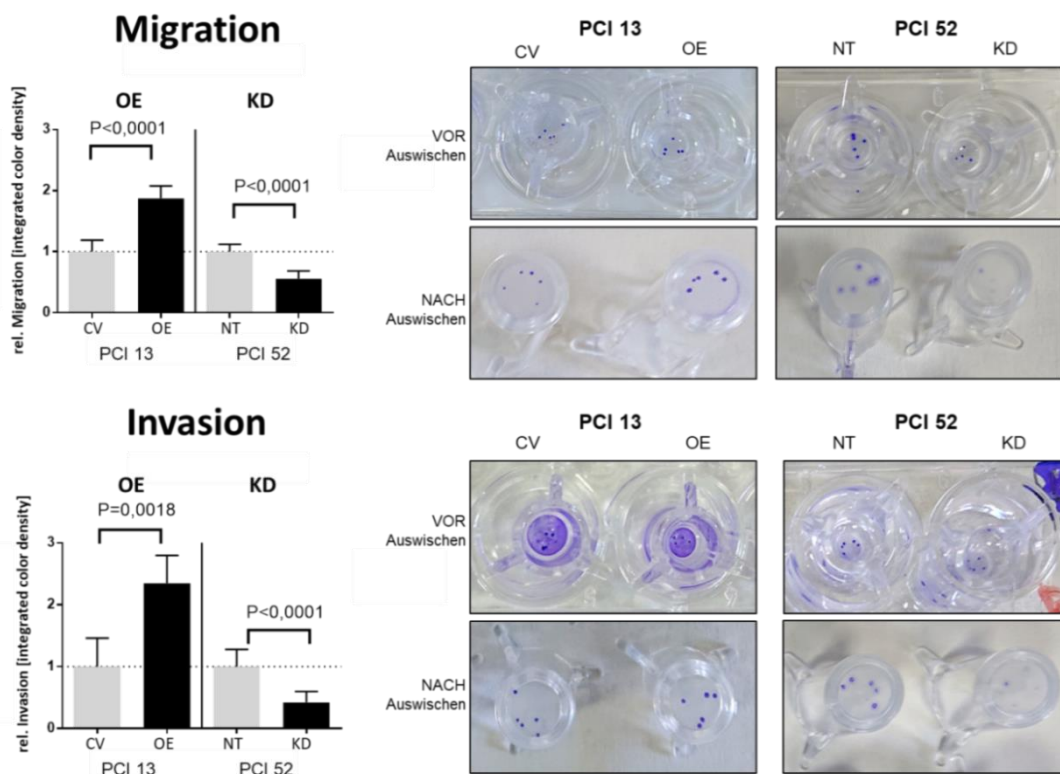


**Abbildung 65** Mikroskopische Aufnahmen der Zelllinie PCI 9 in 4x Vergrößerung. HE-Färbung nach Transfektion mit Leervektor (CV) und IHC-Färbung mit DAB nach PD-L1-Überexpression (OE). Braunfärbung der PD-L1-positiven Zellen. Diese Zellen zeigten eine langgestreckte, spindelförmige Gestalt, im Gegensatz zur typisch rundlichen Morphologie vor der OE.

Diese morphologischen Änderungen waren ein starker Hinweis auf den Zusammenhang zwischen PD-L1 und EMT. Daher sollte geprüft werden, ob die Expression von PD-L1 Einfluss auf Migration und Invasion hat. Es wurde eine HNSCC-Zelllinie mit niedriger (PCI 13) und eine mit hoher PD-L1-Basalexpression (PCI 52) ausgewählt und deren Migration/Invasion entlang eines chemotaktischen Gradienten untersucht. Dafür wurden Sphäroide mit jeweils 20.000 Zellen in eine Boyden-Kammer transferiert. Die Sphäroide sollten innerhalb von 48 Std entlang eines FCS-Konzentrationsgradienten zwischen 2 % und 10 %, durch eine permeable Membran migrieren. Für das Invasionsexperiment wurde die permeable Membran vor dem Experimentstart zusätzlich mit der Basalmatrix-ähnlichen Schicht Matrigel® bedeckt. Der PD-L1 Gehalt wurde in der niedrig PD-L1-Expimierenden Zelllinie PCI 13 mittels Plasmid-Transfektion überexprimiert und in der PD-L1 hoch-expimierenden Zelllinie PCI 52 mittels siRNA KD herunterreguliert. Nach Modulation der PD-L1-Expression wurden bei allen Sphäroiden Unterschiede in der chemotaktischen Migration und Invasion im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen beobachtet. Als Kontrollen für KD und OE dienten Zellen, die mit nicht-zielgerichteter siRNA (NT) bzw. Leervektor (CV) transfiziert wurden.

Wie in **Abbildung 66** ersichtlich, zeigte sich nach PD-L1 OE in Zelllinie PCI 13 eine signifikant erhöhte Migration und eine noch stärkere Invasion entlang des Gradienten, im Vergleich zum Transfektions-Kontrolle. Der siRNA KD von PD-L1 führte in der Zelllinie PCI 52 zu einer geringeren Migrationsfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Die Invasion wurde durch den KD noch stärker inhibiert, als die Migration.

Repräsentativ werden fotografische Aufnahmen der Inserts nach Ablauf des Experiments gezeigt. An der permeablen Membran anhaftende Zellen wurden mit Kristallviolett blau gefärbt. Bilder „vor dem Auswischen“ zeigen Zellen, die an beiden Seiten der permeablen Membran haften. Also Zellen, die nach der Aussaat keine Fähigkeit zur Migration zeigten und noch an der Innenseite des Inserts hafteten sowie Zellen die innerhalb der 48 Stunden Inkubationsdauer entlang des Konzentrationsgradienten auf die andere Seite der permeablen Membran migrierten bzw. invadierten. Bilder „nach dem Auswischen“ zeigen ausschließlich die Zellen, die auf die andere Seite der permeablen Membran gelangten. Zellen auf der Innenseite des Inserts wurden entfernt. Erst dann ergaben sich deutliche Unterschiede.



**Abbildung 66** Migrations- und Invasionsfähigkeit von Sphäroiden der Zelllinien PCI 13 und PCI 52 entlang eines chemotaktischen Gradienten. In der Boyden-Kammer herrschte ein Konzentrationsgradient von 2-10 % FSC. Zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit wurde die Innenseite des Inserts mit Matrigel® beschichtet. Analysiert wurden jeweils fünf Sphäroide pro Kammer. Die Experimentdauer betrug 48 Std. In PCI 52 wurde ein PD-L1 KD durchgeführt, in PCI 13 eine OE. Gezeigt werden exemplarische Fotos von Sphäroiden in der Boyden-Kammer nach Färbung mit Kristallviolett, vor und nach dem Auswischen der Zellen der Insert-Innenseite. Quantifiziert wurde die Dichte der integrierten Farbdichte, im Vergleich zur Transfektions-Kontrolle (NT bzw. CV). N=4, Student's T-Test (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.5 Regulation von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien

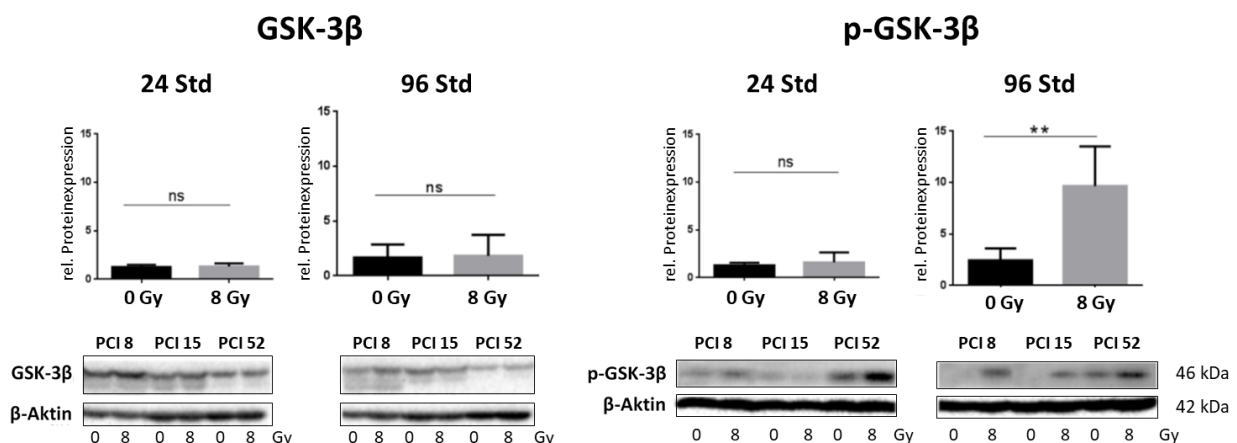
#### 3.5.1 Stabilisierung von PD-L1 nach Radiatio durch Inhibition von GSK-3 $\beta$

Infolge der Radiatio konnte eine Stabilisierung von PD-L1 in den RR HNSCC-Zelllinien beobachtet werden. Mittlerweile sind verschiedene Mechanismen bekannt, die für diese Stabilisierung verantwortlich sein können. Im Folgenden wurde untersucht ob die Stabilisierung von PD-L1 in den hier untersuchten Zelllinien durch die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  erfolgt.

##### 3.5.1.1 Expression von GSK-3 $\beta$ und p-GSK-3 $\beta$

**Abbildung 67** zeigt die Proteinexpression von GSK-3 $\beta$  und die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) an der Aminosäure Serin 09 (Ser09) zu einem frühen (24 Std) und einem späten Zeitpunkt (96 Std) nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  führt hier zur Inaktivierung von GSK-3 $\beta$ .

Die Expression von GSK-3 $\beta$  änderte sich in den RR Zelllinien weder 24 noch 96 Std nach der Bestrahlung. Die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  an Ser09 war in der RR Zelllinie PCI 52 bereits nach 24 Std nach der Bestrahlung nachweisbar. 96 Std nach der Bestrahlung wurde in allen drei RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  signifikant induziert.



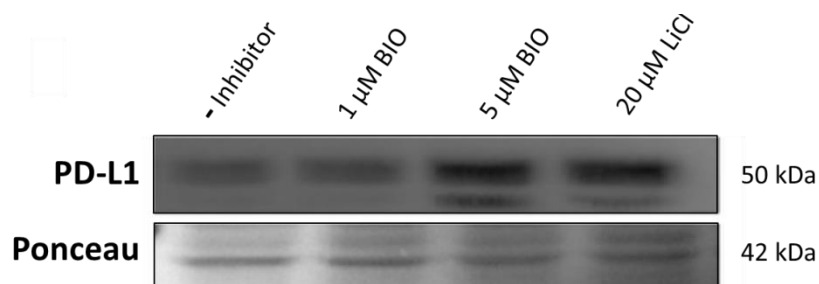
**Abbildung 67** Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  in den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 nach Bestrahlung mit 8 Gy. Proteinexpression von GSK-3 $\beta$  und p-GSK-3 $\beta$ , 24 und 96 Std nach der Bestrahlung. Die repräsentativen Banden des WB, sowie die semiquantitative Analyse zeigten keine Änderung der GSK-3 $\beta$  Expression in den RR Zelllinien nach der Bestrahlung. 96 Std nach der Bestrahlung war die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  an Ser09 on allen RR Zelllinien signifikant erhöht. Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienten als Kontrolle.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. N=3, Student's T-Test (ns = nicht signifikant, \*\* =  $p < 0,01$ ).

### 3.5.1.2 Einfluss der GSK-3 $\beta$ Inhibition auf die PD-L1-Expression

**Abbildung 68** zeigt den direkten Einfluss einer GSK-3 $\beta$  Inhibition auf die PD-L1-Expression. Als repräsentative Zelllinie wurde PCI 52 ausgewählt, welche unter den untersuchten HNSCC-Zelllinien die höchste PD-L1-Basalexpression aufwies. GSK-3 $\beta$  wurde mit zwei unterschiedlichen Inhibitoren inaktiviert.

Der spezifische Inhibitor BIO wurde in den zwei Konzentrationen 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M inkubiert. Hier wurde die Phosphorylierung an Tyr276/216, einer Bindestelle des aktiven Zentrums von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  blockiert. Bei dieser Inhibition zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der PD-L1-Expression.

Ebenfalls wurde der Einfluss des unspezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitors Lithiumchlorid (LiCl) auf die PD-L1-Expression untersucht. Auch die unspezifische GSK-3 $\beta$  Inhibition führte zu einer Zunahme der PD-L1-Expression.

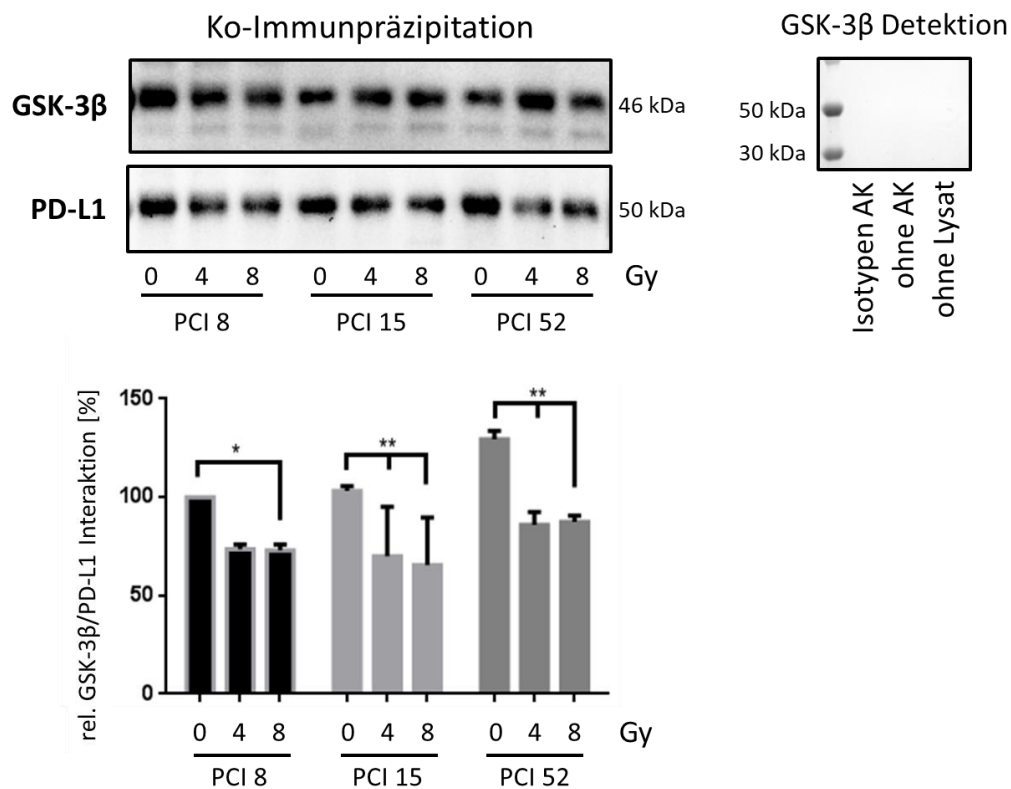


**Abbildung 68** Änderung der PD-L1-Proteinexpression nach GSK-3 $\beta$ -Inaktivierung der Zelllinie PCI 52. Der repräsentative Blot zeigte eine Induktion der Expression nach 24-stündiger Inkubation mit dem spezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitor BIO, in den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M und nach Inkubation mit 20 mM des unspezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitors LiCl. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Lösungsmittel behandelt wurden. N=3. Ponceau S-Färbung diente als Ladekontrolle.

### 3.5.1.3 Nachweis der direkten Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$ und PD-L1

**Abbildung 69** zeigt das Ergebnis einer WB-Analyse nach Ko-IP von GSK-3 $\beta$ , zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1. Analysiert wurden die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression.

Der repräsentative WB zeigt den Anteil an GSK-3 $\beta$ , der durch einen Capture-AK aus dem Zell-Lysat selektioniert wurde, als Ladekontrolle. Im selben Präzipitat konnte auch die Anwesenheit von PD-L1 nachgewiesen werden, was auf eine direkte Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1 deutete. Die semiquantitative Analyse zeigte 96 Std nach Bestrahlung in allen drei untersuchten Zelllinien eine signifikante Abnahme der Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1. Diese Abnahme ist unabhängig von der Bestrahlungsdosis. Die Bestrahlung mit 4 und 8 Gy zeigte vergleichbare Effekte. Die fehlende GSK-3 $\beta$  Signaldetektion in den Kontrollen schloss eine Detektion unspezifischer Bindungen aus.



**Abbildung 69** WB-Analyse nach Ko-IP als Nachweis einer direkten Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1 in den Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, 96 Std nach Bestrahlung mit 4 und 8 Gy. Ein spezifischer anti-GSK-3 $\beta$  AK diente in der Ko-IP als Capture-AK. GSK-3 $\beta$  diente für die Analyse daher als Ladekontrolle. PD-L1 wurde als direkter Interaktionspartner im WB detektiert. Die semiquantitative Analyse zeigte die relative Interaktion von GSK-3 $\beta$  mit PD-L1 in Prozent [%]. Nicht-bestrahlte Zellen (0 Gy) dienten als Kontrolle. Nicht-bestrahlte Zellen der Zelllinie PCI 8 dienten als Referenzprobe für die Quantifizierung. Die Inkubation mit einer GSK-3 $\beta$  Isotyp-Kontrolle, ohne AK und ohne Lysat zeigten keine unspezifischen Bindungen des GSK-3 $\beta$  Capture-AK. N=3, 2-way ANOVA (\* = p < 0,05; \*\* p = < 0,01).



### 3.5.2 Einfluss des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die PD-L1-Expression

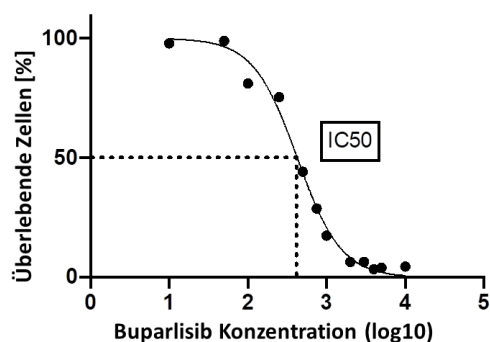
Viele Veröffentlichungen beschreiben den Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und der PD-L1-Expression in Tumorzellen. Auch Radioresistenz soll über diesen Signalweg induziert werden. Daher wurde der Einfluss dieses Signalwegs auf die hier verwendeten HNSCC-Zelllinien näher untersucht.

#### 3.5.2.1 Inhibition von PI3K durch Buparlisib

##### 3.5.2.1.1 Ermittlung der inhibitorischen Konzentrationen

Um die inhibitorischen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors Buparlisib in den verwendeten HNSCC-Zelllinien zu bestimmen, wurden MTT-Proliferations-Assays durchgeführt. Es wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, woraus die  $IC_{50/75}$ -Werte abgeleitet wurden bei der 50 % bzw. 75 % der Zellen durch Inhibition die Proliferation einstellten. Alle verwendeten HNSCC-Zelllinien zeigten, wie in **Abbildung 70** beispielhaft dargestellt, klassische sigmoidale Kurven nach 48, 72 und 96 Std Inkubation mit Buparlisib. Die berechneten Werte unterschieden sich je nach Zelllinie und Inkubationszeit. Die  $IC_{50}$ -Werte der niedrig PD-L1-Exprimierenden Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 waren relativ ähnlich. Die  $IC_{50}$ -Werte der intermediär und PD-L1-hochexprimierenden Zelllinien PCI 8, PCI 15, PCI 52 unterschieden sich stärker voneinander. Alle berechneten  $IC_{50}$ - und  $IC_{75}$ -Werte sind in **Tabelle 49** zusammengefasst. Für die darauffolgenden Experimente wurden diese Werte auf die nächste Hunderterstelle gerundet.

**Tabelle 49** Inhibitorische Konzentrationen von Buparlisib



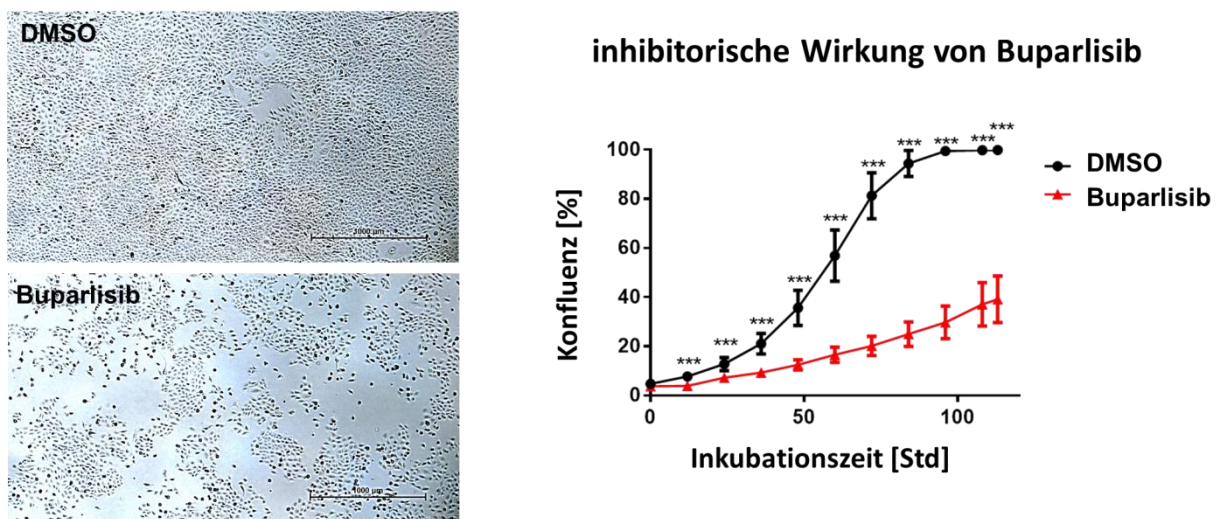
Zelllinie	$IC_{50}$ - 48 Std	$IC_{50}$ - 72 Std	$IC_{50}$ - 96 Std	$IC_{75}$ - 72 Std
PCI 1	1174 nM	1077 nM	879 nM	1496 nM
PCI 9	1196 nM	1085 nM	989 nM	1382 nM
PCI 13	1198 nM	1085 nM	915 nM	1900 nM
PCI 8	646 nM	425 nM	242 nM	862 nM
PCI 15	1248 nM	879 nM	868 nM	1332 nM
PCI 52	1734 nM	1271 nM	942 nM	3152 nM

**Abbildung 70** Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration des PI3K-Inhibitors Buparlisib, bei der 50 % ( $IC_{50}$ ) bzw. 75 % ( $IC_{75}$ ) der Zellen in ihrer Proliferation inhibiert werden. Als repräsentative Zelllinie diente PCI 8.



### 3.5.2.1.2 Antiproliferative Wirkung

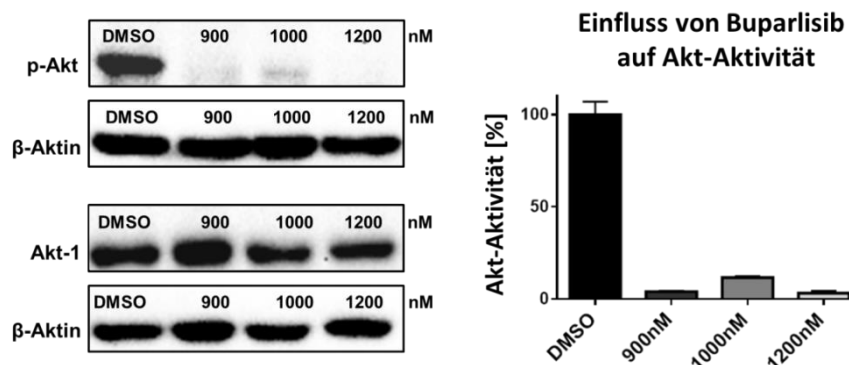
Um den antiproliferativen Effekt der ermittelten inhibitorischen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors Buparlisib zu verifizieren, wurden alle Zelllinien mit den entsprechenden Konzentrationen behandelt. Die Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO diente als Kontrolle. **Abbildung 71** zeigt mikroskopische Aufnahmen und eine *Live Cell Imaging*-Analyse zur Bestimmung der Konfluenz der repräsentativen Zelllinie PCI 15. Die dargestellten Bilder zeigen die Konfluenz nach 72 Std Inkubation mit 1200 nM Buparlisib oder der Lösungsmittel-Kontrolle DMSO. Zu Beginn des Experiments wurden gleiche Zellzahlen in eine 6-Well-Platte ausgesät. 72 Std nach Inkubation zeigten sich, abhängig von der Behandlung, deutliche Unterschiede in der Konfluenz. Eine Quantifizierung bestätigte diese Beobachtung. Für die *Live Cell Imaging*-Analyse wurden identische Zellzahlen in eine 96-Well Platte ausgesät. Während die mit DMSO inkubierten Zellen über den Beobachtungszeitraum von fünf Tagen ungehindert proliferierten, zeigten die mit 1200 nM Buparlisib behandelten Zellen eine signifikant niedrigere Konfluenz. Die Proliferation wurde durch die Behandlung des PI3K-Inhibitors signifikant inhibiert.



**Abbildung 71** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen in 4x Vergrößerung und *Live Cell Imaging*-Analyse der repräsentativen Zelllinie PCI 15. Zellen, die mit 1200 nM Buparlisib behandelt wurden, wiesen eine signifikant niedrigere Konfluenz auf, als mit DMSO behandelte Zellen. Bilder wurden 72 Std nach Inkubation erstellt. *Live Cell Imaging* erfolgte über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen im IncuCyte Zoom. N=8; Student's T-Test mit Holm-Sidak Korrektur (\*\*\*) =  $p < 0,001$ )

### 3.5.2.1.3 Einfluss auf die Akt-Aktivität

Um den Einfluss der PI3K-Inhibition auf die Akt-Aktivität zu prüfen wurde mittels WB-Analyse die Proteinexpression von Akt-1 und die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Ser473 untersucht. **Abbildung 72** zeigt die Ergebnisse für die repräsentative Zelllinie PCI 15, die mit den ermittelten inhibitorischen Konzentrationen 900, 1000 und 1200 nM des PI3K-Inhibitors Buparlisib behandelt wurde. Die Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO diente als Kontrolle. Die WB-Analyse zeigte 72 Std nach der Inkubation mit Buparlisib keine Änderung der Proteinexpression von Akt-1 im Vergleich zur Kontrolle, dagegen zeigte sich eine deutliche Verringerung der Phosphorylierung von Akt. Die semiquantitative Analyse ergab eine signifikante Abnahme der Akt-Aktivität, also dem Quotienten von p-Akt und Akt-1, nach Behandlung mit Buparlisib um das bis zu 40x.

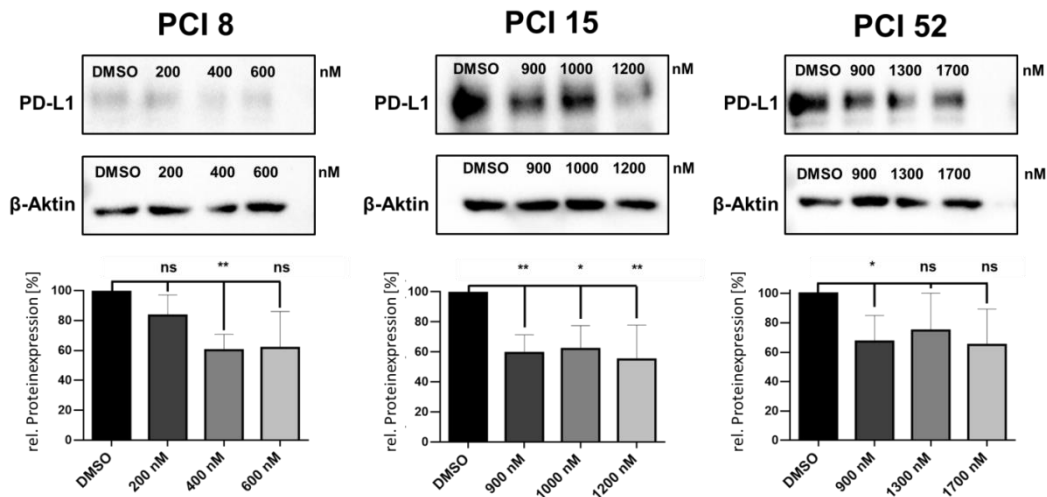


**Abbildung 72** Einfluss des PI3K-Inhibitors Buparlisib auf die Proteinexpression von Akt-1 und die Phosphorylierung von Akt. Buparlisib wurde in den Konzentrationen 900, 1000 und 1200 nM für 72 Std inkubiert. Die Inkubation mit DMSO diente als Kontrolle. Dargestellt werden repräsentative Banden des WB und eine semiquantitative Analyse der Akt-Aktivität. N=2.

### 3.5.2.1.4 Einfluss auf die PD-L1-Gesamtexpression

Um den Einfluss der Akt/PI3K-Inhibition auf die PD-L1-Expression zu prüfen, wurde mittels WB-Analyse die Protein-Gesamtexpression von PD-L1 untersucht. **Abbildung 73** zeigt die Ergebnisse für die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, die im Vergleich zu den RS Zelllinien eine höhere PD-L1-Basalexpression aufwiesen. Jede Zelllinie wurde mit den jeweils ermittelten inhibitorischen Konzentrationen von Buparlisib behandelt. Die Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO diente als Kontrolle. Die repräsentativen Blots und die semiquantitativen Analysen zeigten 72 Std nach der Inkubation mit Buparlisib, für alle verwendeten Konzentrationen, eine teilweise signifikante Reduktion der PD-L1-Expression.

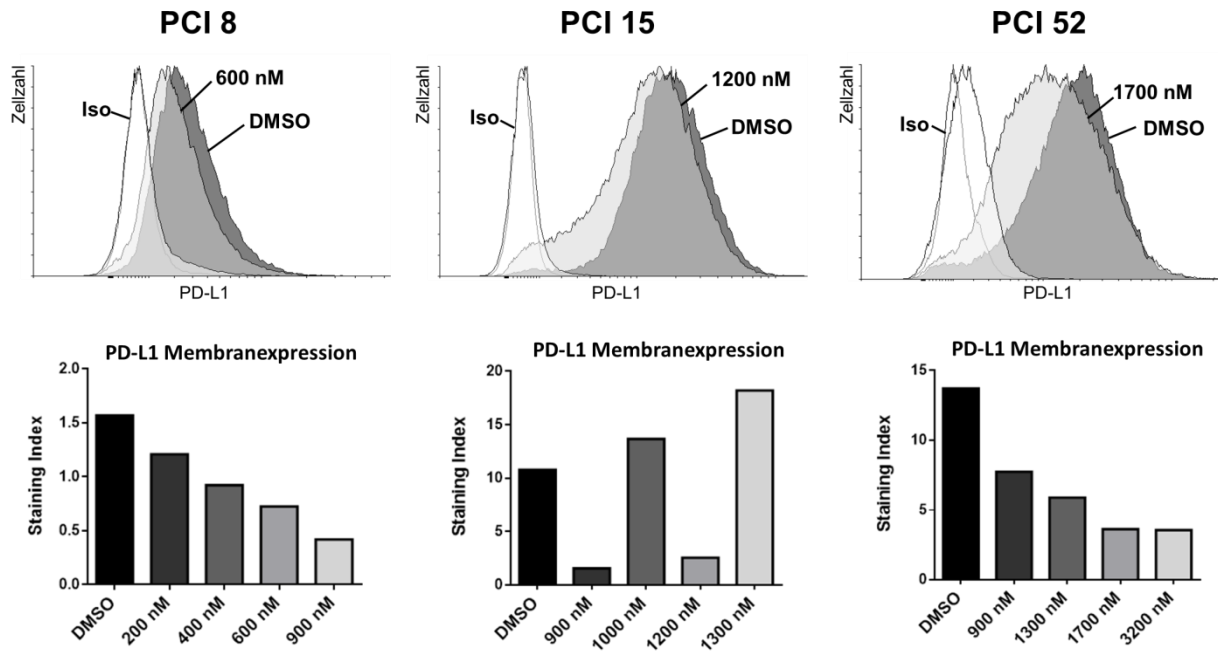
PCI 8 zeigte bei der Inkubation mit 400 nM eine signifikante Reduktion der PD-L1-Expression um den Faktor 0,60 ( $P=0,0048$ ). PCI 15 zeigte bei allen verwendeten Konzentrationen eine signifikante Reduktion (900 nM:  $P=0,0067$  ( $\leq 0,62x$ ), 1000 nM:  $P=0,0164$ , 1200 nM:  $P=0,0293$ ). PCI 52 zeigte Verringerungen um den Faktor 0,65–0,75 mit einer signifikanten Abnahme der PD-L1-Expression bei 900 nM ( $0,67x$ ,  $P=0,0349$ ).



**Abbildung 73** Einfluss der PI3K-Inhibition mit Buparlisib auf die Protein-Gesamtexpression von PD-L1 in Zell-Lysaten der PD-L1-Exprimierenden HNSCC-Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52. Die WB-Analysen zeigten in den untersuchten Zelllinien eine signifikante Abnahme der PD-L1-Proteinexpression nach 72 Std Inkubation mit Buparlisib. N=4, One-Sample T-Test (\* =  $p<0,05$ ; \*\* =  $p<0,01$ ; \*\*\* =  $p<0,001$ ).

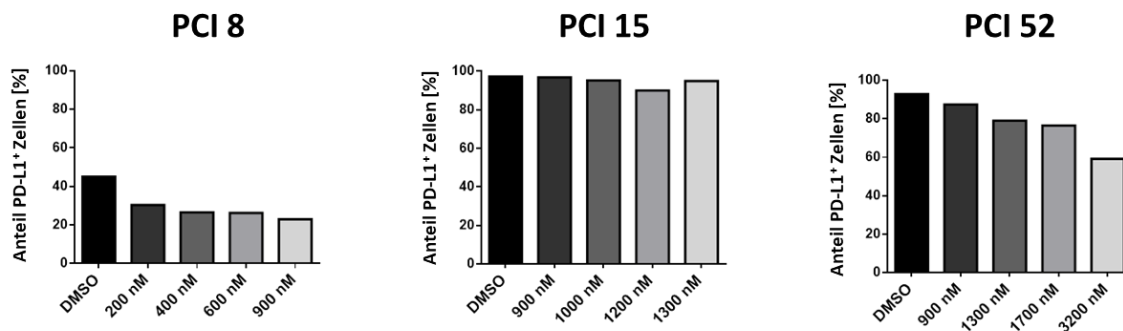
### 3.5.2.1.5 Einfluss auf die PD-L1 Lokalisation

**Abbildung 74** zeigt, dass sich infolge der Inhibition von Akt/PI3K durch Buparlisib auch die Expression von PD-L1 an der Membran der analysierten Zellen änderte. Die nach einer FACS-Analyse erstellten Histogramme zeigen die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, mit ursprünglich hoher PD-L1-Basalexpression (dunkelgrau). Ebenfalls gezeigt werden die RR Zelllinien nach 72-stündiger Inkubation mit Buparlisib (hellgrau). Es konnte eine deutliche Signal-Abnahme infolge der Akt/PI3K-Inhibition beobachtet werden. Dies war einer Verringerung der PD-L1-Membranexpression geschuldet. Die Diagramme zeigten, nach Abzug unspezifischer Bindungen, den SI der vier inkubierten Buparlisib-Konzentrationen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. In PCI 8 und PCI 52 konnte nach Quantifizierung des Signals eine dosisabhängige Reduktion der PD-L1-Expression an der Membran nach 72-Std Buparlisib-Inkubation beobachtet werden (PCI 8:  $0,77-0,27x$ ; PCI 52:  $0,56-0,26x$ ). PCI 15 zeigte diese Reduktion nur in zwei von vier Konzentrationen.



**Abbildung 74** Bestimmung der PD-L1-Membranexpression mittels Durchflusszytometrie. Analysiert wurden die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52, mit hoher PD-L1-Basalexpression. Repräsentative überlagerte Histogramme und die Berechnung des SI zeigten nach 72-stündiger Buparlisib-Behandlung eine verringerte PD-L1-Expression an der Membran von PCI 8 und PCI 52. Nur geringfügige Änderungen der PD-L1-Membranexpression wurden bei PCI 15 gefunden. Die verwendeten Buparlisib-Konzentrationen entsprachen den ermittelten inhibitorischen Konzentrationen. N=1

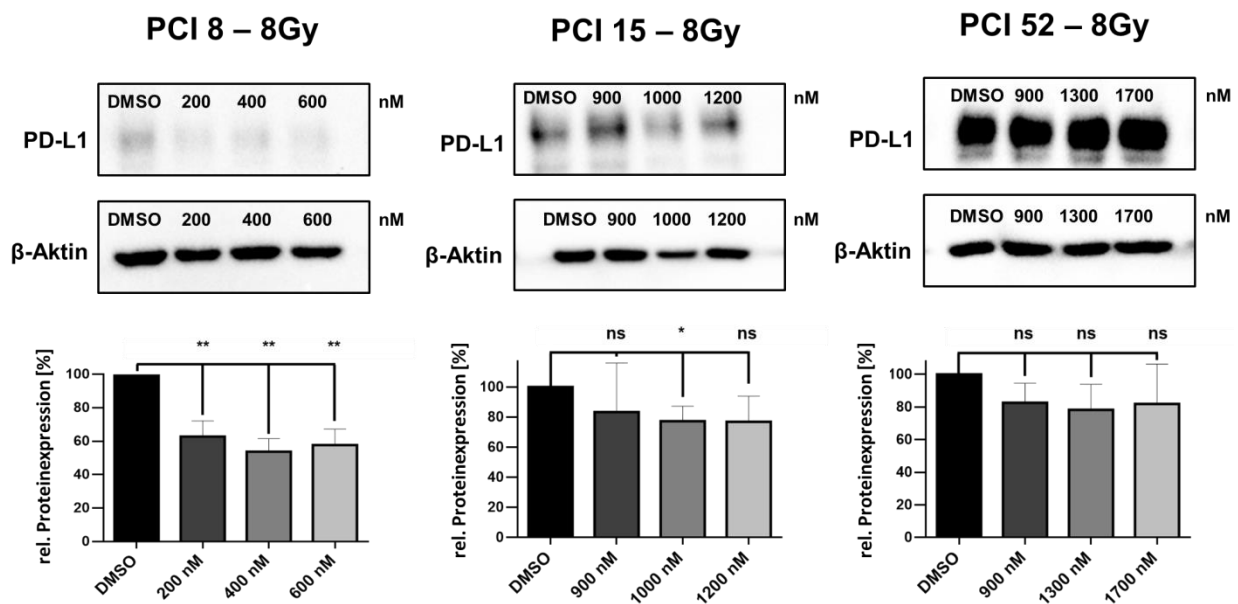
Zusätzlich wurde der Anteil an Zellen mit positiver PD-L1-Membranexpression in der Gesamtpopulation ermittelt. **Abbildung 75** zeigt eine konzentrationsabhängige Abnahme an PD-L1-positiven Zellen in den Zelllinien PCI 8 und PCI 52 nach Inhibition von Akt/PI3K mit Buparlisib im Vergleich zur DMSO-Kontrolle DMSO (PCI 8: 0,67–0,51x; PCI 52: (0,94–0,64x). In der Zelllinie PCI 15 konnten nur geringfügige Änderungen beobachtet werden.



**Abbildung 75** Anteil an Zellen mit positiver PD-L1-Membranexpression an der Gesamtpopulation. Analysiert wurden die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit hoher PD-L1-Basalexpression. Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor Buparlisib in den ermittelten inhibitorischen Konzentrationen führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der PD-L1-positiven Zellpopulation in PCI 8 und PCI 52. N=1

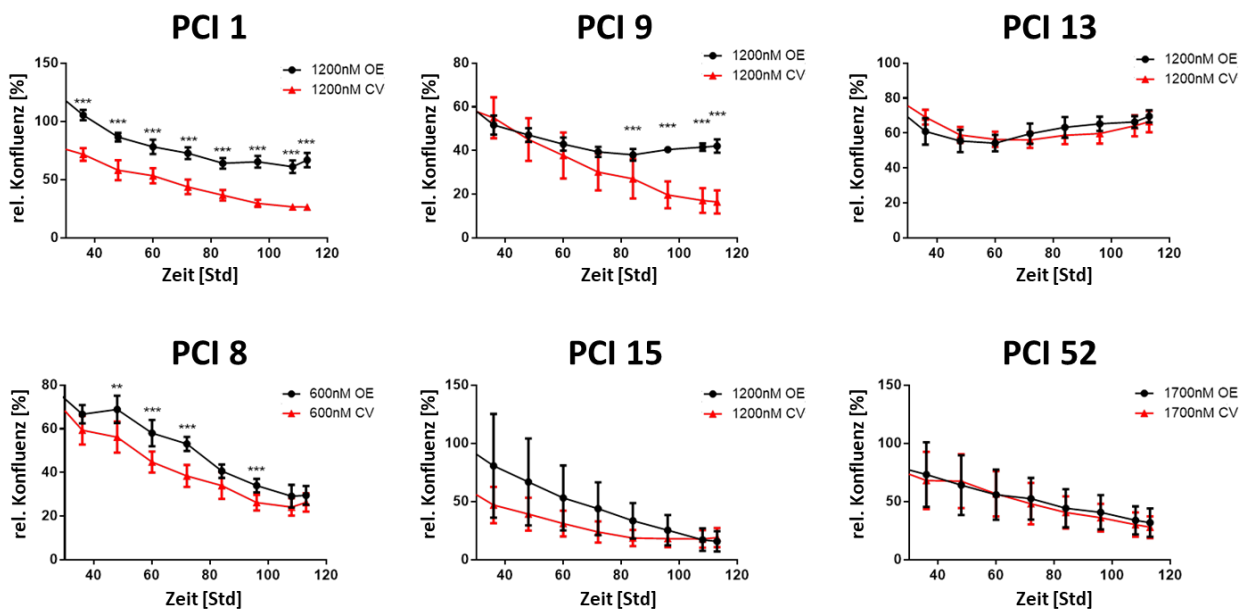
### 3.5.2.1.6 Einfluss von Bestrahlung auf PD-L1 nach Buparlisib Behandlung

Es sollte geprüft werden, ob eine Strahlenbehandlung, mit der daraus resultierenden Induktion der PD-L1-Expression, den Effekt der PD-L1-Reduzierung durch die Buparlisib-Behandlung entgegenwirken kann. Dafür wurden die RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit 8 Gy bestrahlt und unmittelbar danach für 72 Std mit Buparlisib, in verschiedenen inhibitorischen Konzentrationen, behandelt. Die WB-Analysen in **Abbildung 76** zeigt in Zellen, die mit Buparlisib behandelt wurden trotz Bestrahlung eine signifikant geringere PD-L1-Proteinexpression. Die PD-L1-Expression der Zelllinie PCI 8 war weiterhin signifikant reduziert (200 nM:  $\leq 0,63x$ ,  $P=0,0041$ ; 400 nM:  $P=0,0013$ ; 600 nM:  $P=0,0030$ ). Nur in der Zelllinie PCI 52 konnte die Bestrahlung die signifikante Verringerung der PD-L1-Expression durch Buparlisib Inkubation aufgehoben werden (Verringerung der PD-L1-Expression bei 900 nM: um den Faktor 0,78-0,83;  $P=0,0636$ ; 1300 nM:  $P=0,697$ ; 1700 nM:  $P=0,2353$ ). Bei Zelllinie PCI 15 zeigte sich dieser Effekt teilweise (1000 nM: Verringerung der PD-L1-Expression um 0,77x,  $P=0,0198$ ).



**Abbildung 76** Wirkung einer 72-stündigen Buparlisib-Behandlung und zusätzlicher Bestrahlung auf die PD-L1-Proteinexpression der RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52. Bestrahlt wurde mit 8 Gy. Die Buparlisib-Inkubation wurde unmittelbar nach der Bestrahlung gestartet. Die Ergebnisse der semiquantitativen Analysen wurden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt und mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle verglichen. N=4, One-sample T-Test (\* =  $p<0,05$ ; \*\* =  $p<0,01$ ).

Um zu überprüfen, ob eine Induktion der PD-L1-Expression der anti-proliferativen Wirkung des Akt/PI3K-Inhibitors Buparlisib entgegenwirkt, wurde die PD-L1-Expression mittels transients Plasmid-Transfektion in allen sechs Zelllinien induziert. **Abbildung 77** zeigt die *Live Cell Imaging*-Analyse zur Bestimmung der Konfluenz der adhären Zellen. Die Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 8 zeigten in PD-L1 überexprimierenden Zellen (OE), im Vergleich zur Kontrolle (CV), eine signifikant höhere Konfluenz. In diesen Zelllinien konnte die PD-L1-Überexpression die anti-proliferative Wirkung von Buparlisib neutralisieren. PCI 13, PCI 15 und PCI 52 zeigten keine signifikanten Änderungen nach Induktion des PD-L1-Gehalts.

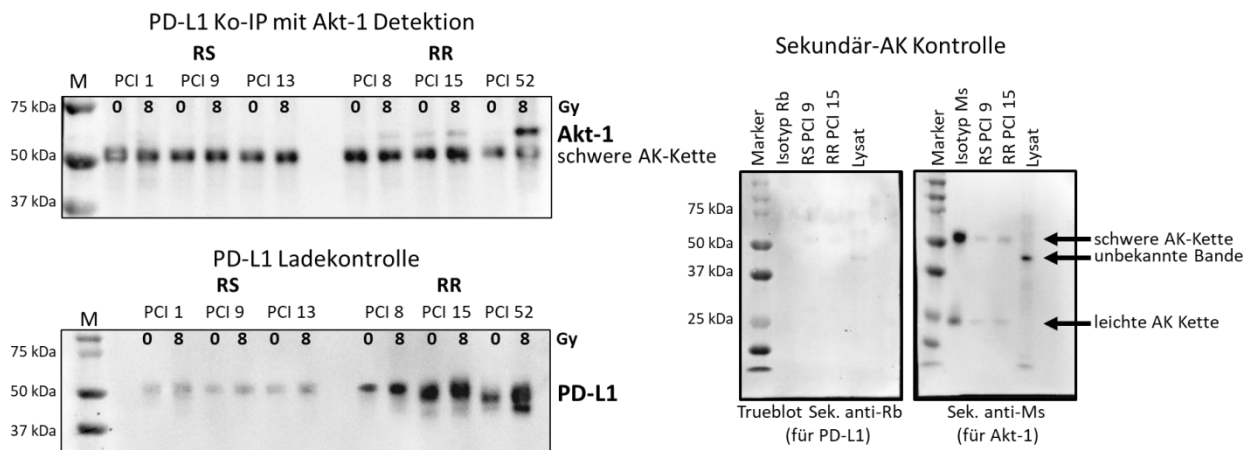


**Abbildung 77** Live Cell Imaging-Analyse zur Bestimmung der Konfluenz. Analysiert wurden die drei RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit geringer PD-L1-Basalexpression und die drei RR Zelllinien mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression: PCI 8, PCI 15, PCI 52. Der PD-L1-Gehalt der Zelllinien wurde mittels transients Plasmid-Transfektion induziert (OE, schwarze Linie). Eine Transfektion mit Leervektor diente als Kontrolle (CV, rote Linie). Die transfizierten Zellen wurden mit der  $IC_{50}$  von Buparlisib, die sich nach 48 Std Inkubationszeit ergab, inkubiert. Die Zellen wurden im IncuCyte-Zoom für 113 Std beobachtet. Die Konfluenz der inhibierten Zellen wurde auf die Konfluenz der entsprechenden DMSO-Kontrollen des jeweiligen Tages bezogen. N=8; Student's T-Test; mit Holm-Sidak-Korrektur (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.5.2.2 Nachweis der direkten Interaktion zwischen PD-L1 und Akt-1

**Abbildung 78** zeigt das Ergebnis einer WB-Analyse nach Ko-IP von PD-L1 zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen PD-L1 und Akt-1. Analysiert wurden RS und RR HNSCC-Zelllinien, mit und ohne Bestrahlung. Es ergab sich eine differenzielle Interaktion von PD-L1 und Akt-1 in RS und RR Zelllinien.

Nicht-bestrahlte RS Zelllinien, mit schwacher PD-L1-Basalexpression, erzeugten auch im Präzipitat nur eine schwache PD-L1-Detektion. 72 Std nach der Bestrahlung war im Präzipitat der überlebenden Populationen der RS Zelllinien die PD-L1-Expression leicht erhöht. Im Vergleich zu den RR Zelllinien war diese Expression insgesamt trotzdem deutlich geringer. Der Nachweis von Akt-1 erfolgte im selben Präzipitat auf Höhe der 60 kDa Bande. Die deutliche und gleichmäßige Bande auf Höhe von 50 kDa repräsentiert die schwere Kette des Ko-IP Capture-AK und ist vernachlässigbar. In den nicht-bestrahlten, sowie den mit 8 Gy bestrahlten RS Zelllinien konnte kein Akt-1 nachgewiesen werden. Anders im Präzipitat der RR Zelllinien, denn in diesen Zelllinien mit hoher PD-L1-Basalexpression, konnte auch im Präzipitat eine große Menge an PD-L1-Protein nachgewiesen werden. 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy war die PD-L1-Expression erhöht. Bereits in den nicht-bestrahlten RR Zelllinien konnte eine leichte Akt-1-Detektion nachgewiesen werden, die in den bestrahlten RR Zelllinien deutlich zunahm.

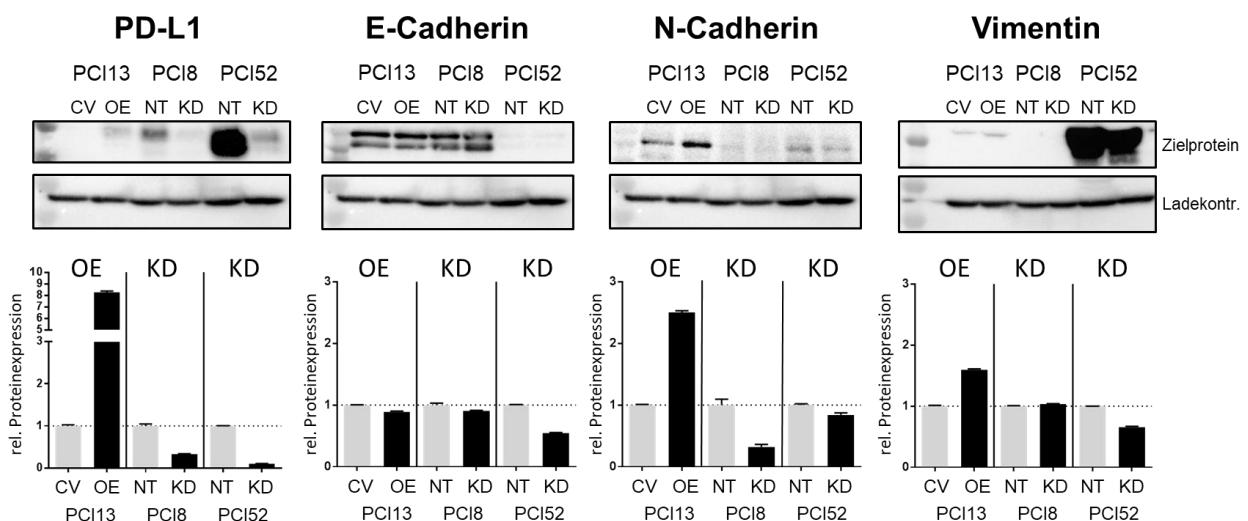


**Abbildung 78** WB-Analyse des Präzipitats nach PD-L1-Ko-IP. Nur in RR Zelllinien wurde Akt-1 als direkter Bindungspartner von PD-L1 nachgewiesen. Diese Bindung nahm 72 Std nach Bestrahlung zu. Die Detektion von PD-L1 diente als Ladekontrolle. Der Sekundär-AK erkannte neben dem spezifischen Akt-1 Primär-AK auch die schwere Kette des PD-L1-Capture-AK im Präzipitat auf einer Höhe von 50 kDa. Für die Detektion von PD-L1 als Ladekontrolle wurde ein spezieller Trueblot-Sekundär-AK verwendet der die denaturierten leichten und schweren Ketten des Capture-AK laut Hersteller nicht detektiert. Nur eine schwache Kreuzreaktion mit schweren und leichten AK-Ketten aus der Immunpräzipitation war sichtbar. Akt-1 wurde mit einem herkömmlichen sekundären anti-Ms-AK nachgewiesen. Hier war eine Kreuzreaktion mit den schweren und leichten AK-Ketten des Capture-AK auf einer Höhe von 50 kDa und 25 kDa deutlich sichtbar.

### 3.5.3 Einfluss von PD-L1 auf die Ausrichtung des Zytoskeletts

Um den Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und der Metastasierung zu eruieren, wurden die verwendeten Zelllinien in 3D-Zellkultur näher charakterisiert. Es wurde jeweils eine Zelllinie mit niedriger (PCI 13), mittlerer (PCI 8) und hoher (PCI 52) PD-L1-Expression verwendet und der PD-L1-Gehalt in diesen Zelllinien modifiziert. In Zelllinie PCI 13 wurde der PD-L1-Gehalt mittels transients Plasmid-Transfektion überexprimiert (OE). In den Zelllinien PCI 8 und PCI 52 wurde der PD-L1-Gehalt mittels siRNA-Transfektion (KD) herunterreguliert.

Im Anschluss wurde die PD-L1-Expression analysiert sowie die differenzielle Expression der bekannten EMT-Marker E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin. **Abbildung 79** zeigt die Banden einer WB-Analyse und der semiquantitativen Analyse. Die RS Zelllinie PCI 13 mit niedriger PD-L1-Basalexpression exprimierte den epithelialen Marker E-Cadherin, aber kein Vimentin. Eine PD-L1-Überexpression bewirkte die starke Zunahme in der Expression der mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin. Die RR Zelllinie PCI 52 mit hoher PD-L1-Basalexpression exprimierte den mesenchymalen Marker Vimentin aber kein E-Cadherin. Der PD-L1-Knockdown bewirkte eine starke Abnahme der mesenchymalen Markers Vimentin. Die intermediär PD-L1-Exprimierende Zelllinie PCI 8 zeigte eine deutliche Expression des epithelialen Markers E-Cadherin aber kein Vimentin. Ein KD führte zu einer starken Herunterregulation des mesenchymalen Markers N-Cadherin.



**Abbildung 79** Repräsentativer WB mit semiquantitativer Analyse der relativen Genexpression von PD-L1, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin. Analysiert wurden PCI 13, PCI 8 und PCI 52. Der PD-L1-Gehalt von PCI 13 wurde mittels transients Plasmid-Transfektion überexprimiert (OE), der von PCI 8 und PCI 15 mittels siRNA-Transfektion (KD) herunterreguliert. Ein Leervektor (CV) und NT siRNA (NT) dienten als Kontrolle. Die Proteinexpression der Zielproteine wurde auf die jeweilige Transfektions-Kontrolle bezogen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. N=2.



### **3.5.3.1 Migration auf Poly-L-Lysin, Fibronektin, Kollagen I, Laminin-reicher Matrix**

**Abbildung 80** zeigt die Ausbreitung von HNSCC-Sphäroiden der Zelllinien PCI 13, PCI 8 und PCI 52 mit niedriger, mittlerer und hoher PD-L1-Expression. Um die Abhängigkeit von PD-L1 für die Migration auf unterschiedlichen Matrixkomponenten zu überprüfen wurde der PD-L1 Gehalt in den verwendeten Zelllinien verändert. Reduziert wurde der PD-L1 Gehalt mittels siRNA-Transfektion (KD) in Zelllinien mit mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression. Induziert wurde der PD-L1 Gehalt mittels transients Plasmid-Transfektion (OE) in Zelllinien mit niedriger, mittlerer und hoher PD-L1-Basalexpression. Die transfizierten Sphäroide wurden auf verschiedene Beschichtungen, bestehend aus unterschiedlichen Matrixkomponenten und Zusammensetzungen gegeben, darunter waren Kollagen Typ I, Fibronektin und eine Laminin-reiche Matrix (Matrigel®). Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin diente als Kontrolle für eine Integrin-unabhängige, unspezifische Adhäsion. Ziel des Experiments war es, die Ausbreitung der Zellen auf verschiedenen Matrices, abhängig von ihrem PD-L1 Gehalt, zu bestimmen.

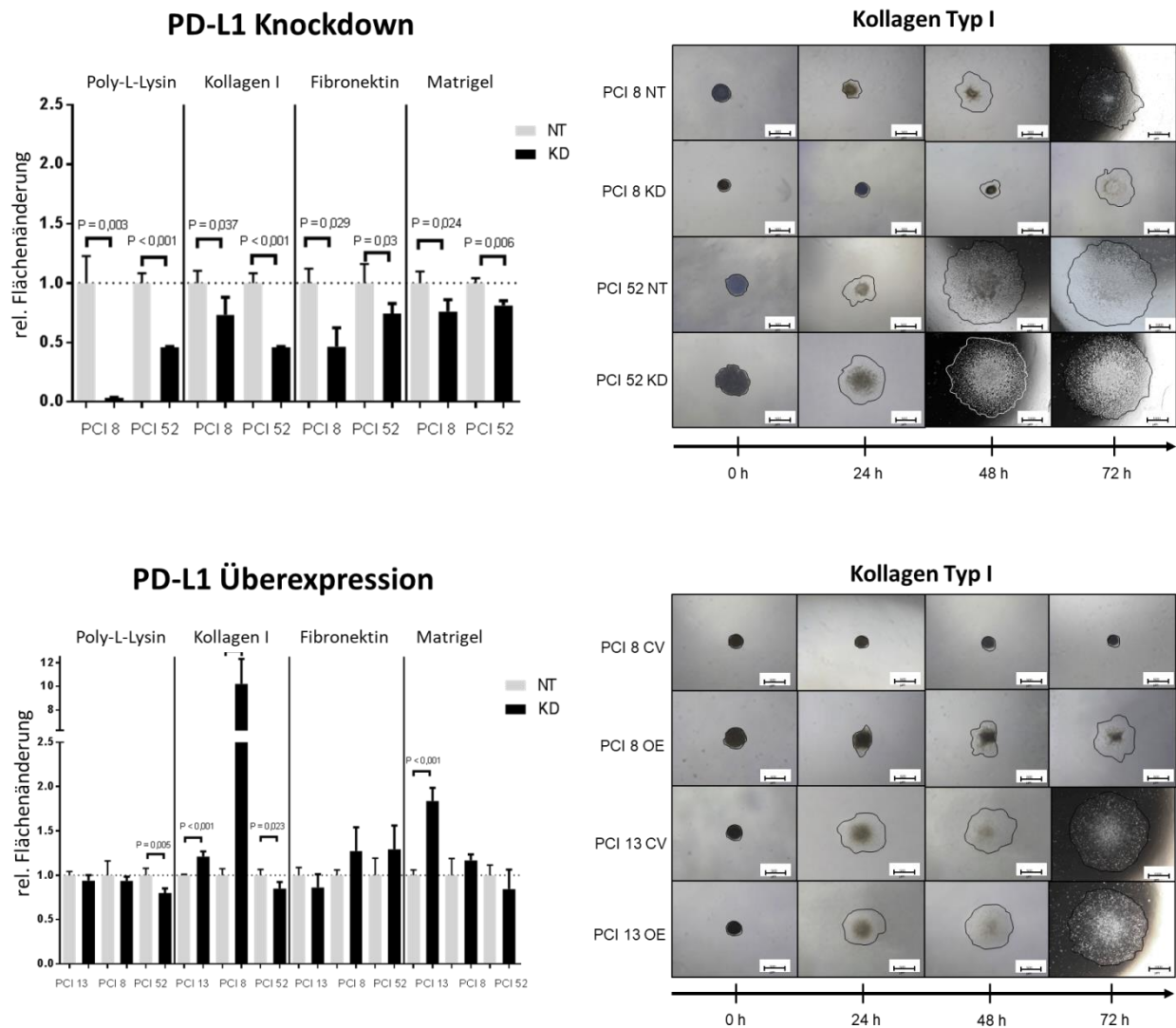
Nach Reduktion der PD-L1-Expression war die Migration insgesamt signifikant geringer als in den Transfektions-Kontrollen. Ein PD-L1 KD in mäßig PD-L1-Expimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 8 führte teilweise zur keiner Adhärenz und einer Schrumpfung des Sphäroids auf der Poly-Lysin-Beschichtung, was teilweise zu einer äußerst verringerten Flächenausbreitung führte. Wenn hingegen Matrixbestandteile, wie Fibronektin, Kollagen Typ I und Laminin vorhanden waren, überlebten die Zellen und konnten sich ausbreiten.

Ein KD in den PD-L1 hoch-expimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 52 zeigte auf allen getesteten Matrixkomponenten eine signifikante Abnahme der Flächenausbreitung.

Eine Induktion der PD-L1-Expression führte, abhängig von der untersuchten Zelllinie und der Beschichtung, zu unterschiedlichem Migrationsverhalten. PD-L1 OE in den Sphäroiden der Zelllinie PCI 13 mit ursprünglich niedriger PD-L1-Basalexpression zeigte die stärkste Zunahme der Flächenausbreitung auf den Beschichtungen mit Matrigel® und Kollagen Typ I. Poly-L-Lysin und Fibronektin ergaben keine signifikanten Änderungen.

In den moderat PD-L1-Expimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 8 führte die PD-L1 OE zu einer 10x Erhöhung der Flächenausbreitung auf der Beschichtung mit Kollagen Typ I. Die anderen Beschichtungen hätten auf die Flächenausbreitung keinen Einfluss.

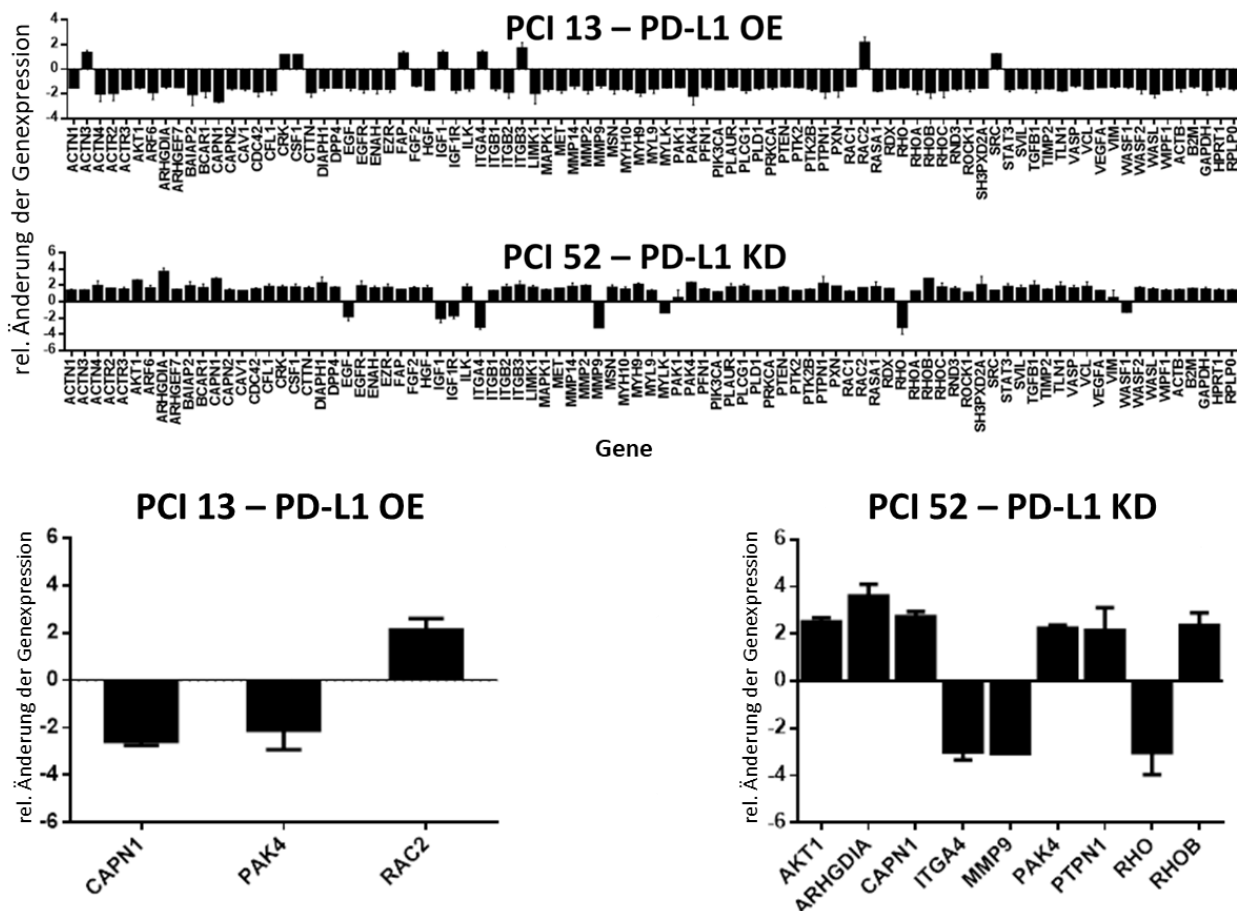
Die OE in PD-L1 hoch-expimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 52 kam es auf Poly-L-Lysin und Kollagen Typ I zu einer signifikanten Verringerung der Flächenausbreitung.



**Abbildung 80** Sphäroide aus Zelllinien mit niedriger (PCI 13), mittlerer (PCI 8) und hoher (PCI 52) PD-L1-Expression wurden auf vier unterschiedlichen Beschichtungen ausgesät: Poly-L-Lysin, Kollagen Typ I, Fibronectin und Matrigel®, einer Laminin-Kollagen Typ IV-reichen Matrix. Die Ausbreitung der adhärenen Zellen wurde über einen Zeitraum von 72 Std ab der Aussaat alle 24 Std in 4- oder 2x Vergrößerung fotografiert. Die Flächenzunahme wurde mit Hilfe der Software ImageJ 1.8.0 vermessen. N=4. (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ) Student's T-Test. Repräsentative Bilder zeigen die Flächenausbreitung auf Kollagen Typ I. PCI 8 und PCI 52 zeigen die Änderung der Flächenzunahme nach dem PD-L1 KD im Vergleich zur Transfektions-Kontrolle (NT). PCI 8 und PCI 13 zeigen die Flächenausbreitung nach PD-L1 Überexpression im Vergleich zur Transfektions-Kontrolle (CV).

### 3.5.3.2 Genexpressions-Analyse Zellmotilitäts-assoziiierter Gene

Um die PD-L1-abhängige Expression Zellmotilitäts-assoziiierter Gene zu untersuchen, wurde ein RT<sup>2</sup>-qPCR-Array (Qiagen) durchgeführt. Exemplarisch wurden Sphäroide einer niedrig und einer PD-L1 hochexprimierenden Zelllinie analysiert. Die PD-L1-Expression der Zelllinie PCI 13 wurde mittels transientser Plasmid-Transfektion erhöht (OE) und mit einer Leervektor-Transfektions-Kontrolle verglichen. Die PD-L1-Expression der Zelllinie PCI 52 wurde mittels siRNA-Knockdown reduziert (KD) und mit einer NT-Transfektions-Kontrolle verglichen. **Abbildung 81** zeigt die Änderung der Genexpression nach Modulation der PD-L1-Expression. Genexpressionen, die sich mindestens um den Faktor 2 veränderten, wurden in einem gesonderten Diagramm dargestellt. PCI 13 zeigte eine Zunahme der Genexpression von RAC2 (2,12x). PAK4 (2,11x) sowie CAPN1 (2,58x) wurden herunterreguliert. PCI 52 zeigte eine Induktion der Genexpression von Akt1 (2,51x), ARHGIDIA (3,59x), CAPN1 (2,72x), PAK4 (2,24x), PTPN1 (2,13x) und RhoB (2,35x). Die Gene ITGA4 (2,99x), MMP9 (3,06x) und RHO (3,03x) wurden herunterreguliert.



**Abbildung 81** Ergebnisse des RT<sup>2</sup>-qPCR Arrays zur Analyse zellmotilitäts-assoziiierter Gene. Analysiert wurden Sphäroide der Zelllinie PCI 13 nach PD-L1 OE und PCI 52 nach PD-L1 KD. Die Transfektion mit Leervektor bzw. NT siRNA diente als Kontrolle. Genexpressionsänderungen  $\geq$  Faktor 2 waren jeweils gesondert in einem Diagramm dargestellt. N=3.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung des Modells zur Untersuchung von Radioresistenz im HNSCC

Um die Mechanismen weiter aufzuklären, die in Tumoren des Kopf-Halsbereichs zur Vermittlung von Radioresistenz führen, wurde zunächst ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert.

#### 4.1.1 Auswahl geeigneter Zelllinien

Die Verwendung von Zelllinien eignet sich im Allgemeinen besonders gut für die Untersuchung grundsätzlicher, regulatorischer Mechanismen, die in Zellen ablaufen (211). Entscheidend für die Beantwortung der Fragestellungen dieses Projekts war es, HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität zu verwenden. Hierfür wurden insgesamt zehn HNSCC-Zelllinien des Pittsburgh Cancer Institutes (PCI), die freundlicherweise von Theresa L. Whiteside gespendet wurden, auf ihre Radiosensitivität untersucht. Die Zelllinien wurden mit einem Linearbeschleuniger des Universitätsklinikums Regensburg bestrahlt, der primär zur Behandlung von Patienten dient. Grundsätzliches Ziel der Bestrahlung ist es, die Proliferation von Tumorzellen zu hemmen und Apoptose zu induzieren (139). So wurden die Zelllinien einmalig mit einer Dosis von 12 Gy bestrahlt und anhand von verschiedenen, unabhängigen Methoden auf deren Zellmorphologie, Stoffwechselaktivität, Verdopplungszeit und Induktion von Apoptose untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden jeweils drei besonders radiosensitive und drei besonders radioresistente Zelllinien für weitere Experimente ausgewählt.

Die ausgewählten Zelllinien waren alle unterschiedlichen Ursprungs. Diese stammten nicht nur aus verschiedenen Patienten mittleren und hohen Alters, sondern auch aus unterschiedlichen Regionen des Kopf-Hals-Bereichs. Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um Resektionen von unbehandelten Primärtumoren, ohne vorheriger Chemo- oder Radiotherapie, ausgenommen der Zelllinie PCI 8. Bei dieser Zelllinie handelte es sich nicht um Zellen eines Primärtumors, sondern um die einer Metastase (**Tabelle 1**) (194,195). Bereits die morphologischen Unterschiede zwischen den verwendeten Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien deuten auf eine gewisse Diversität der verwendeten Zelllinien hin (**Abbildung 40**).

PCI 1, PCI 9 und PCI 13, Tumorzellen aus Larynx, Zungengrund und der retromolaren Region, reagierten besonders sensitiv auf Bestrahlung. Diese Zelllinien zeigten schon einen Tag nach der Bestrahlung einen Verlust ihrer Membranintegrität. Über den Beobachtungszeitraum von fünf Tagen konnte eine sukzessive Abnahme der Stoffwechselaktivität sowie

eine Verlangsamung der Verdopplungszeit beobachtet werden. Die *Live Cell Imaging*-Analyse zeigte vor allem in bestrahlten Zellen einen vielfach höheren Anteil an apoptotischen Zellen als die nicht-bestrahlte Kontrolle (**Abbildung 41-45**). Diese Zelllinien wurden als radiosensitiv (RS) eingestuft. Die erhöhte Apoptoserate in der nicht-behandelten Kontrolle der RS Zelllinien, deutete auf eine generell stärkere Reaktion der RS Zelllinien auf äußere Einflüsse hin, wie unter Umständen die Ernte sowie Temperaturschwankungen und Bewegung, bedingt durch den Transport zur Bestrahlung (**Abbildung 44 und 49**).

PCI 8, PCI 15 und PCI 52 hingegen, Tumorzellen aus dem Sinus pyriformis sowie der Plica aryepiglottica, wurden aufgrund ihrer Reaktion auf Bestrahlung mit 12 Gy als radioresistent (RR) eingestuft. Der Großteil der Population hielt trotz Bestrahlung seine Stoffwechselaktivität konstant oder steigerte sie im Laufe des Beobachtungszeitraums von fünf Tagen, ähnlich wie die nicht-bestrahlte Kontrolle. Der Anteil apoptotischer Zellen war in den Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 deutlich geringer als in den RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13. Die Verdopplungsrate verlangsamte sich nach der Bestrahlung nicht signifikant und die Zellen erreichten fünf Tage nach der Bestrahlung trotzdem eine hohe Konfluenz (**Abbildung 41-45**). Diese Zelllinien wurden als radioresistent (RR) eingestuft (**Tabelle 48**). Bereits die Ergebnisse der Etablierungsexperimente deuteten darauf hin, dass in den RR Zelllinien Signalwege aktiv sein können, die infolge der Bestrahlung ein Einleiten von Apoptose gezielt unterbinden. Der anatomische Ursprung selbst gab keinen Hinweis auf die Radiosensitivität der verwendeten Zelllinien und die damit assoziierte Aggressivität der Tumorzellen.

#### 4.1.2 Bestrahlungsdosis

Auch wenn sich deutliche Unterschiede in der Reaktion auf Bestrahlung zwischen den Zelllinien zeigten, reagierte keine Zelllinie absolut resistent oder sensitiv auf die Bestrahlung. Trotzdem ergaben sich zwischen den als RS und RR eingestuften Zellen deutliche Unterschiede in Bezug auf deren Reaktion auf die Bestrahlung. Die FACS-Analyse, dargestellt in **Abbildung 49**, zeigte deutlich, dass nach der Bestrahlung mit 8 Gy von den als RR eingestuften Zelllinien im Mittel auch ein Anteil von 19-26 % der Population Apoptose induzierte. Im Vergleich dazu induzierten bei den als RS eingestuften Zelllinien mit 75-80 % signifikant mehr Zellen Apoptose.

Die Stärke der Reaktion auf Bestrahlung ist auch abhängig von der Bestrahlungsdosis. Eine höhere Bestrahlungsdosis hat in der Regel mehr DNA Schäden zur Folge (212). Sich an den

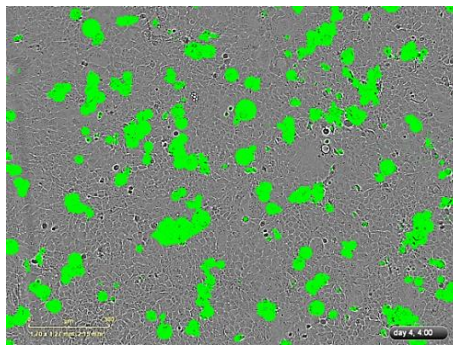
für Patienten verabreichte Strahlungsdosen zu orientieren, ist für die Arbeit mit Zelllinien nur schwer umsetzbar. Je nach Zeitpunkt der Diagnose, dem TNM-Status und der Frage, ob die Bestrahlung mit anderen Therapieformen kombiniert wird, wird eine Gesamtdosis von bis zu 70 Gy in fraktionierten Einzeldosen von  $\pm 2$  Gy verabreicht (158). Die Literaturrecherche zur Bestrahlung von verschiedenen HNSCC-Zelllinien ergab übliche Bestrahlungsdosen zwischen 2 Gy und 25 Gy (213–215). In Vorexperimenten wurden Bestrahlungsdosen von 2, 4, 8, 12 und 16 Gy getestet (nicht gezeigt). Dort zeigte sich, dass eine Dosis von 8 Gy in den HNSCC-Zelllinien zwar eine nachweisbare Reaktion hervorruft, welche allerdings nicht zu gravierend in den Metabolismus der Zellen eingreift, um somit noch die Erforschung von Signalwegsregulationen zu ermöglichen. Daher wurde für alle Hauptversuche eine Bestrahlungsdosis von 8 Gy verwendet. Um einen dosisabhängige Regulation zu beweisen, wurde in manchen Experimenten zusätzlich mit 4 Gy bestrahlt (**Abbildung 50 und 69**). Für die Diskriminierung von RS und RR Zelllinien wurde in Vorversuchen sogar eine Bestrahlungsdosis von 12 Gy gewählt, um die Zellen mit einer einmaligen Bestrahlung stärker zu selektionieren.

Ziel der Bestrahlung ist es, DNA-Doppelstrangbrüche in Tumorzellen zu verursachen. Die mangelnde Fähigkeit von Zellen, solch gravierende DNA-Schäden zu reparieren und der damit einhergehenden genomischen Instabilität sollen die Zellen zur Induktion von Apoptose zwingen (**siehe 1.4.3**). Die Induktion und Reparatur von DSB kann mit einem Antikörper gegen das phosphorylierte Histon  $\gamma$ H2AX nachgewiesen werden. Dieses Histon markiert DSB in der Zelle und bildet das Gerüst für die DSB-Reparaturmaschinerie. Die Induktion erfolgt innerhalb von wenigen Minuten nach der Bestrahlung und erreicht ihr Maximum bei etwa 30 Minuten (216). In Zukunft könnte ein Nachweis der Anzahl verursachter DSB in den verwendeten Zelllinien abhängig von der gewählten Bestrahlungsdosis einen genaueren Aufschluss über die Effektivität der Bestrahlung geben.

#### **4.1.3 Konfluenzbedingter Selektionsdruck**

Um den Selektionsdruck und damit eine ungewollte Differenzierung von Zellen in der laufenden Zellkultur zu minimieren, wurde das Medium bei Erreichen von 80 % Konfluenz oder spätestens nach drei Tagen gewechselt. Dies garantierte zudem eine optimale Nährstoffversorgung und hielt die Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte auf einem Minimum. Ebenso wurde bei der Durchführung der Experimente darauf geachtet, dass die Zellen von der Aussaat bis zur Ernte subkonfluent blieben. Denn Zellen, die sich

konfluenzbedingt über gewisse Zeit in der stationären Phase der Proliferation befinden, induzieren ebenfalls Apoptose. Neben einem extremen Zell-Zell-Kontakt führen auch Nährstoffmangel und die Akkumulation toxischer Substanzen im Medium zu einem sehr hohen Selektionsdruck, sodass einige Zellen in eine Regressions- und Absterbephase übergehen (217). Ohne ein Passagieren war, abhängig von der verwendeten Zelllinie, spätestens nach fünf Tagen Kultivierung ein Maximum einer optimalen Kultivierung erreicht. Selbst die Aussaat mit wenigen Zellen generierte nach fünf Tagen sehr dichte Einzelkolonien. **Abbildung 82** ist repräsentativ für den Effekt der Kontakthemmung. Dieser wurde vermutlich auch in **Abbildung 44 und 45** bei der nicht-bestrahlten Kontrolle beobachtet werden.



**Abbildung 82** Die repräsentative Aufnahme des *Live Cell Imaging* in 10x Vergrößerung zeigt grün-fluoreszierende Zellen, die sich, vermutlich bedingt durch einen starken Zell-Zell-Kontakt, in einer Regressions- und Absterbephase befanden.

#### 4.1.4 Angewandte Methoden

Die hier für die Etablierung des Modells angewandten Methoden, also die Bestimmung der Vitalität und des Zelltods durch kolorimetrische oder fluoreszierende Farbstoffe (WST-1, MTT, YOYO-1, Annexin V, DAPI), sind gut geeignet für die Charakterisierung einer Population zu einem definierten Zeitpunkt. Diese Assays geben jedoch keinen Einblick in die langfristigen Folgen der Bestrahlung. Dafür wäre beispielsweise der sogenannte *colony-forming* Assay (218) ideal. Die Untersuchung langfristiger Auswirkungen der ionisierenden Bestrahlung in weiterführenden Arbeiten wäre auch unter einem anderen Aspekt interessant. Denn durch Selektion derjenigen Zellen, die Radio langfristig überleben und koloniebildende Eigenschaften zeigen, können potenzielle Tumorstammzellen zur näheren Charakterisierung angereichert werden.

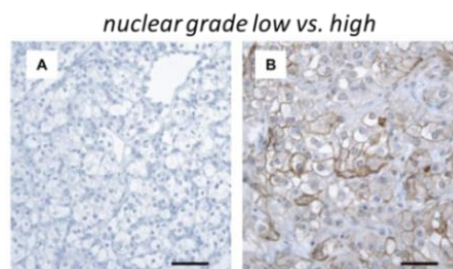
Zusammenfassend lässt die Homologie der generierten Daten darauf schließen, dass die Unterteilung der Zelllinien in radiosensitiv und radioresistent korrekt erfolgte und dies ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Radioresistenz darstellt.

## 4.2 PD-L1 als klinischer Biomarker

In dieser Arbeit wurde besonderer Fokus auf die Expression von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien gelegt, um dessen Regulation und zellintrinsische Funktion im HNSCC näher zu untersuchen. PD-L1 in der Klinik als prädiktiven Biomarker zu verwenden ist derzeit umstritten. Der Zweck eines zuverlässigen prädiktiven Biomarkers ist es, dem Arzt aufzuzeigen, welcher Therapieansatz den besten Behandlungsverlauf bringt und welche Therapie mit hoher Wahrscheinlichkeit nur Nebenwirkungen ohne Erfolgsaussicht (219). Auch ob ein Patient für eine Immuncheckpoint-Blockade geeignet ist, hängt davon ab, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Patient von dieser Therapie profitieren wird. PD-L1 ist zwar ein recht verlässlicher Marker für Tumoren mit positivem PD-L1-Status, dagegen ist er umso unzuverlässiger für Patienten mit negativem PD-L1-Status. Dennoch wird der PD-L1-Status, neben anderen Markern, mittlerweile standardmäßig für die Therapieplanung immunhistochemisch ausgewertet (220). Gründe für das unzuverlässige prädiktive Potenzial von PD-L1 könnten mitunter die derzeitige uneinheitliche Bestimmung des PD-L1-Status eines Tumors oder die zellintrinsische Wirkung von PD-L1 in Tumoren sein, die den Therapierfolg erschweren.

### 4.2.1 Bestimmung des PD-L1-Status

Bereits die Entnahme der Biopsie aus dem Tumorgewebe ist entscheidend für die Bestimmung des PD-L1-Status, da dieses entnommene Gewebe im Idealfall die Gesamtheit des Tumors repräsentieren soll. Die PD-L1-Expression kann jedoch innerhalb des Tumorgewebes sehr heterogen sein. Pathologen sollten daher *high nuclear grade* Bereiche des Tumors zur Bestimmung des PD-L1-Status verwenden, um falsch-negative Ergebnisse der IHC-Auswertung zu vermeiden. Dies sind Areale mit hohem Anteil undifferenzierter Zellen (221). Bei der Verwendung von Zelllinien ist dies natürlich irrelevant, da Zelllinien eine einheitliche Zellpopulation mit ähnlichem Differenzierungsgrad darstellen. In der Klinik kann dies jedoch ein ernstzunehmendes Problem darstellen.

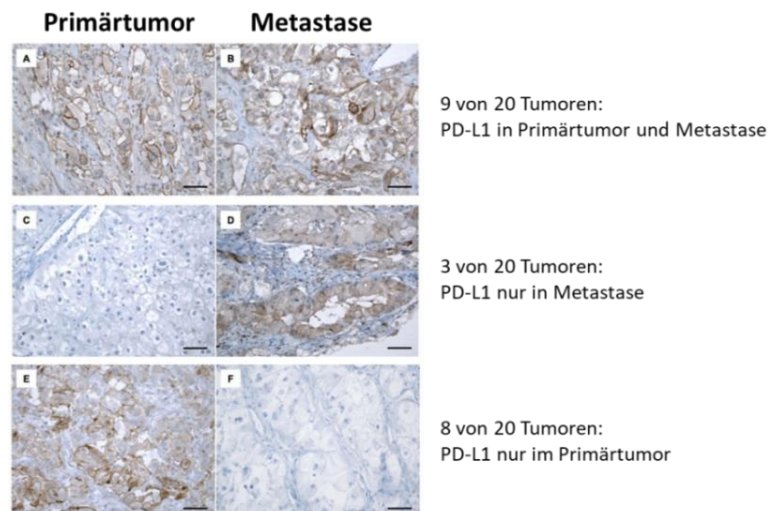


**Abbildung 83** Repräsentative Bilder desselben primären RCC mit heterogener PD-L1-Expression. **A** PD-L1-Membranexpression ist negativ in differenzierten Bereichen des Tumors (*low nuclear grade*) und **B** mit hoher PD-L1-Membranexpression in undifferenzierten Bereichen (*high nuclear grade*). Der Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$  (221).



Nicht nur innerhalb des Tumorgewebes, sondern auch zwischen Primärtumor und Metastase können sich Unterschiede in der PD-L1-Expression zeigen. Callea und Kollegen untersuchten in Nierenzellkarzinomen (RCC) näher, ob sich Primärtumor und die korrespondierende Metastase in ihrer PD-L1-Expression unterscheiden. 20 der 53 untersuchten Paare waren PD-L1-positiv. In neun Fällen zeigten sowohl Primärtumor als auch die Metastase PD-L1-Expression. In drei Fällen konnte nur in der Metastase PD-L1 nachgewiesen werden und in acht Fällen nur im Primärtumor. Somit unterschied sich in 21 % der Fälle die PD-L1-Expression in Metastase und Primärtumor (**Abbildung 84**) (221).

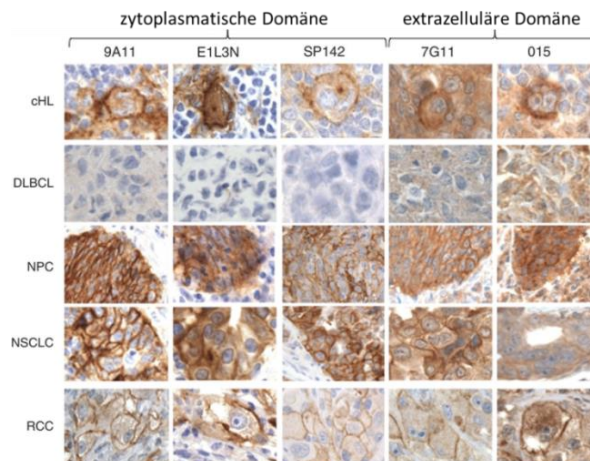
Dies impliziert, dass sich der PD-L1-Status während der Tumorprogression verändern kann. Die PD-L1-Expression muss im Laufe der Tumorprogression nicht immer zunehmen, auch eine Abnahme ist möglich. In dieser Arbeit wurden mit fünf HNSCC-Zelllinien aus einem Primärtumor (PCI 1, PCI 9, PCI 13, PCI 15 und PCI 52) und eine Zelllinie aus einer Metastase (PCI 8) verwendet (**Tabelle 1**). Obwohl eine Metastase häufig mit aggressiveren mesenchymalen Tumoreigenschaften assoziiert ist (EMT), scheint bspw. die Zelllinie PCI 8 nach der Metastasierung wieder einen etwas epithelialeren Charakter entwickelt zu haben (MET).



**Abbildung 84** Repräsentative Bilder von drei RCC nach IHC-Membranfärbung von PD-L1. **A, C, E** Links jeweils die Primärtumoren **und B, D, F** rechts daneben die korrespondierenden Metastasen. **A, B** PD-L1-Expression wurde sowohl im Primärtumor als auch in der Metastase nachgewiesen. **C, D** PD-L1-Expression wurde nur in der Metastase nachgewiesen. **E, F** PD-L1-Expression wurde nur im Primärtumor nachgewiesen. Der Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$  (221).

Nach Entnahme einer Tumorbiopsie erfolgt die Bestimmung des PD-L1-Status durch eine IHC-Färbung. Hierfür können verschiedene Assays, Färbeprotokolle, Scoring Algorithmen und Antikörper verwendet werden (222–226). Grundsätzlich können die verfügbaren Antikörper in zwei Gruppen unterteilt werden: Antikörper, die an die zytoplasmatische Domäne von PD-L1 binden und diejenigen, die an die extrazelluläre PD-L1 Domäne binden.

Diese vielen Möglichkeiten, die in derselben Gewebeprobe zu unterschiedlichen Aussagen führen können, spiegeln den dringenden Bedarf nach Vereinheitlichung wider (227). **Abbildung 85** zeigt Färbungen von fünf verschiedenen klinisch verwendeten anti-PD-L1 Antikörpern an Gewebeproben unterschiedlicher Tumorentitäten (228). Darunter befand sich auch der Antikörperklon E1L3N, der in dieser Arbeit für WB-Analysen eingesetzt wurde (**Tabelle 22**). Diese Abbildung verdeutlicht, dass sich abhängig vom verwendeten Antikörper durchaus Unterschiede in den Färbe-Intensitäten derselben Gewebeprobe ergeben können.



**Abbildung 85** Vergleich monoklonaler anti-PD-L1 Antikörper in einer IHC-Färbung. Gefärbt wurde mit den PD-L1 Antikörperklonen 9A11, 7G11, E1L3N, 015 und SP142. PD-L1-Expression äußert sich in einer Braunfärbung. Die verwendeten Gewebeproben stammen aus einem klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL), diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL), Nasopharynxkarzinom (NPC), nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) und Nierenzellkarzinom (RCC).

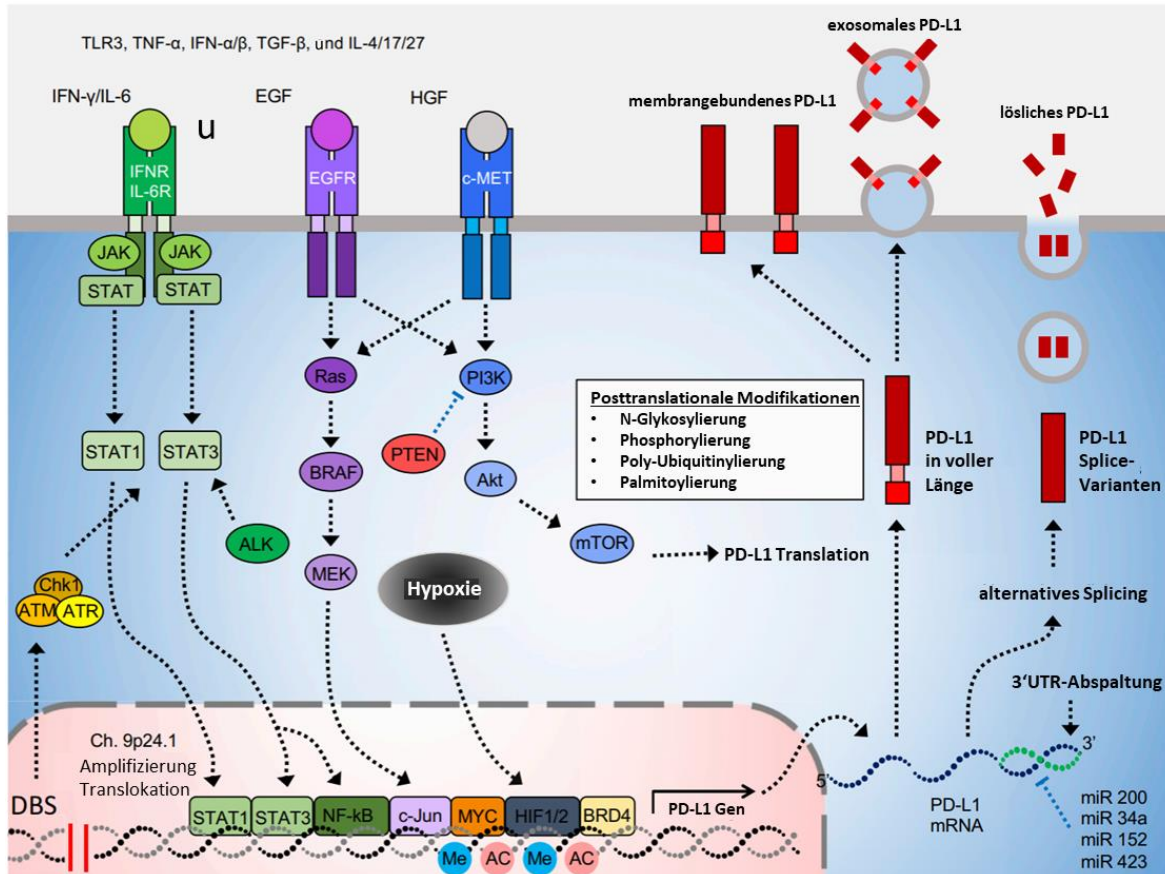
Somit könnte eine fehlerhafte Bestimmung des PD-L1-Status erklären, weshalb auch Patienten mit PD-L1-negativ eingestuftem Tumoren trotzdem von einer Blockade der PD-1/PD-L1-Achse profitieren (176). Genauso kann das Ansprechen eines PD-L1-negativ eingestuftem Tumors dadurch bedingt sein, dass sich Tumoreigenschaften im Laufe der Progression und infolge der Behandlung ändern und Tumorzellen erst nach Entnahme der Biopsie eine erhöhte PD-L1-Expression aufweisen. Fast noch wichtiger als der PD-L1-Status alleine ist der sogenannte CPS-Score (engl.: *combined positive score*), bestehend aus PD-L1 in Tumorzellen und infiltrierenden T-Lymphozyten.

#### 4.2.2 Zellintrinsische Funktionen von PD-L1

Ein Erklärungsansatz für ein fehlendes Ansprechen von Tumoren mit positivem PD-L1-Status auf Behandlungen verschiedener Art, darunter die Antikörper-Immuntherapie sowie die Strahlen- oder Chemotherapie, könnten die zellintrinsischen Funktionen bieten, die in Tumorzellen durch eine PD-L1-Expression vermittelt wird. Denn im Allgemeinen wird Tumorzellen mit PD-L1-Expression ein aggressiver Phänotyp zugesprochen (229).

Bekannt wurde PD-L1 als membranständiges Protein mit der Fähigkeit Antitumor-Immunantworten abzuschwächen. Doch jüngste Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass PD-L1 auch eine intrinsische Wirkung auf die Zellproliferation, das Metastasierungsverhalten und auf stammzelltypische Wachstumsmuster des Tumors ausübt. Auch Chemo- und Radioresistenz soll in Tumorzellen mit PD-L1-Expression erhöht sein. Für eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern bietet PD-L1 dann zwar im Allgemeinen ein sehr gutes Angriffsziel, doch die Vermittlung von Resistenzen gegenüber verschiedener Behandlungsmethoden kann die Vorhersage über den Behandlungsverlauf stark beeinflussen.

Mittlerweile sind bereits verschiedene Mechanismen zur Regulation von PD-L1 bekannt, genauso wie verschiedene Stimuli, die die PD-L1-Expression induzieren. Cha und Kollegen veröffentlichten 2019 einen Review Artikel, in dem das derzeitige Wissen über die komplexe Regulation von PD-L1 zusammengefasst wurde (230). **Abbildung 86** aus diesem Artikel umfasst die genomischen Veränderungen, die transkriptionale Regulation, posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen sowie den exosomalen Transport von PD-L1. Stimulation kann über den IFN-, EGF- und c-Met-Rezeptor erfolgen oder durch Hypoxie induziert werden. Einige Mechanismen können je nach Tumorart variieren (231).



**Abbildung 86** Überblick über die Regulation und Expression von PD-L1 in einer somatischen Zelle. Modifiziert nach (230).

Fehlregulierte Signalwege sowie genomische Mutationen begünstigen die Tumorprogression (232–234). Erfolgt während der Karzinogenese zudem eine Erhöhung der PD-L1-Expression wird die antitumorale Immunantwort abgeschwächt und Tumorzellen sind in der Lage, ihr Potenzial zur Proliferation und Metastasierung ungehindert zu entfalten.

Eine erhöhte PD-L1-Expression kann durch die im Tumorgewebe sezernierten proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 bedingt sein (99,235,236).

Auch eine verstärkte Aktivierung von Signalwegen, wie dem JAK/STAT-, MAPK- und der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, die durch Mutation bestimmter Signalwegsfaktoren wie PTEN beeinflusst werden, können die PD-L1-Expression erhöhen (232–234,237).

Onkogene Transkriptionsfaktoren, wie HIF1/2 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B oder MYC, der in etwa 70 % der Tumoren fehlreguliert ist, können die Transkription des PD-L1-Gens induzieren (238).

Das PD-L1-Protein kann durch posttranslationale Modifikationen, wie einer Glykosylierung, vor der Degradation geschützt und stabilisiert werden.

Auch MikroRNAs (miRNAs), die aus nur 20-22 Nukleotiden bestehen, regulieren ebenfalls die Genexpression, indem sie die 3'UTR von kodierenden mRNA-Transkripten abspalten und dieses somit funktionslos machen. Aktuelle Studien zeigen, dass eine fehlregulierte Expression von miRNAs die Metastasierung von Tumoren begünstigt und eine antitumorale Immunantwort abschwächt (239). Die miR-200, ein Suppressor der EMT und der Tumormetastasierung, zielt direkt auf die 3'UTR des PD-L1-Gens CD274 ab. Im NSCLC wirkt dem eine verstärkte Expression von ZEB1 entgegen (240). Neben miR-200 zielt ebenfalls miR43a auf die 3'UTR von CD274 ab. Eine verringerte Expression von miR-34a führt im NSCLC so zu einer erhöhten PD-L1-Expression. Eine erhöhte Präsenz von miR-34a konnte die Radio- und Chemoresistenz erhöhen und die antitumorale Immunantwort stärken (241,242). Diese beiden miRNAs werden durch den Tumorsuppressor p53 reguliert. Die in Tumoren häufig vorkommende Mutation des p53 Gens kann daher auch zur Fehlregulation dieser miRNAs und verstärkter PD-L1-Expression führen. Eine Regulation von PD-L1 durch miRNAs wurde auch in anderen Tumorentitäten beobachtet (243,244).

Zudem können auch epigenetische Veränderungen in der CD274 Sequenz, durch Histon-Methylierung oder –Acetylierung, möglicherweise die Bindung von miRNAs verhindern (245).

In der Tumorzelle führt eine PD1/PD-L1 Interaktion zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. Dadurch wird die tumorintrinsic Glykolyse beschleunigt, die der Tumorzelle anti-apoptotische Signale vermittelt und so das Überleben der Tumorzelle verlängert (5). In Untersuchungen an Melanom- und Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie an immuninkompetenten Mäusen führte ein Knockdown der PD-L1-Expression zu einer verringerten Zellproliferation, einer Abschwächung der mTORC1-Aktivität und verstärkter Autophagie (246). Umgekehrt unterliegt die PD-L1-Expression der translationalen Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg (180). Doch auch unabhängig von der Interaktion mit T-Zellen können konservierte PD-L1-Motive Tumorzellen vor Interferon- und STAT3-vermittelter Toxizität schützen und so die Tumorprogression begünstigen (247).

Ebenfalls wurde die PD-L1-Expression in Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften assoziiert. Beim Mammakarzinom zeigte sich PD-L1 mit Nanog, Oct4 und BMI1 hochgradig assoziiert. Ein Knockdown von PD-L1 führte *in vitro* und *in vivo* zu einer Reduktion der stammzelltypischen Fähigkeit zur Zellerneuerung (248). Beim Mammakarzinom konnte eine PI3K/AKT und ERK/MAPK vermittelte Regulation von *multidrug resistance protein* (MDR)1 durch PD-L1 mit entsprechender Chemoresistenz nachgewiesen werden (249).

Darüber hinaus scheint PD-L1 eine intrinsische Rolle für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu spielen, wie beim Ösophaguskarzinom durch Manipulation des zytoplasmatischen Anteils von PD-L1 gezeigt werden konnte (250). In einer Studie von Ock und Kollegen wurden Tumorgewebeprobe von 50 Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht. 64 % der Gewebeprobe waren PD-L1-positiv. In diesen Geweben war die PD-L1-Expression signifikant mit EMT assoziiert (46,9 %) (251). PD-L1 könnte daher ein potenzieller Marker für das Vorhandensein von Fernmetastasen in HNSCCs sein (252).

Auch eine Veröffentlichung von Dong und Kollegen beschreibt den Einfluss von PD-L1 auf Zellproliferation, Metastasierungsverhalten, stammzelltypische Eigenschaften und Chemo-resistenz, vermittelt durch verschiedene Signalwegsregulatoren. Auch eine immunsuppressive Wirkung von PD-L1 im Cholangiokarzinom wurde beschrieben. Diese war bedingt durch die Inhibition von Tumorstammzeleigenschaften (253).

PD-L1 steht auch seit längerem in Verdacht, an der Reparatur von DSB beteiligt zu sein (254), zumal PD-L1 infolge von DBS induziert wird (255,256). Vor kurzem wurde PD-L1 als ein neuartiges RNA-Bindeprotein beschrieben, das die Medikamentenresistenz in Tumor-

zellen verstärkt, indem es die Stabilität verschiedener mRNAs erhöht, die für Proteine codieren, die an der DNA *damage response* beteiligt sind (257). Es wurde bisher angenommen, dass die Prozessierung von RNA nicht Teil der DNA *damage response* ist. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die RNA-Prozessierung direkt an der klassischen Reparatur von DNA-Schäden durch BRCA1 (258) und BRCA2 (259,260) beteiligt ist. Es wurde berichtet, dass PD-L1 als RNA-Bindeprotein fungiert, um Ziel-RNA vor dem Abbau zu schützen, indem es mit EXOSC10 und EXOSC4, den Schlüsselkomponenten des RNA-Exosoms, einem Multiprotein-Nuklease Komplex (261,262), interagiert (263). Ein Knockdown von PD-L1 erhöhte die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin und erhöhte auch die Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (257). Genomweite RNA-Transkripte, die mit PD-L1 interagieren, wurden durch die RNA-Immunpräzipitations-Sequenzierung (RIP-seq) gewonnen. Diese wurde nach einem PD-L1-Knockdown auf Änderung der genomweiten Genexpression analysiert. Etwa 135 Gene waren induziert. Darunter waren ATM, BRCA1 und FANCL sowie andere Gene, die an zellulären Reaktionen auf Stoffwechsel-, Transkriptions- und Proteinmodifikationsebene von DNA-Schäden beteiligt sind (257).

Ein PD-L1-Antikörper, H1A, wurde entwickelt, um PD-L1 durch Blockade des PD-L1-Stabilisators CMTM6 (264) zu destabilisieren. Dies führte zum lysosomalen Abbau von PD-L1 und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Strahlentherapie und Cisplatin (257). Diese Studien deuten darauf hin, dass eine gezielte intrazelluläre PD-L1-Behandlung die Wirksamkeit der Chemo- oder Strahlentherapie verbessern kann.

Beim HNSCC fehlt bisher jeglicher Nachweis einer intrinsischen Signalwirkung von PD-L1 und dessen Einfluss auf die Strahlensensitivität. Gegenstand der geplanten Untersuchungen soll daher sein, ob und wie PD-L1 eine intrinsische Funktion im Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom ausübt und ob die PD-L1-Expression über die genannten Signalwege einen intrinsischen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit nimmt.

### 4.3 PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität

PD-L1 wird auf etwa 30 % der soliden Tumoren und einigen hämatologischen Erkrankungen exprimiert, darunter auch verstärkt in HNSCCs (265–267). Durch Blockade des Immunsystems und der Generierung eines immunsuppressiven Tumormilieus wird PD-L1 ein aggressiver Phänotyp zugesprochen (268). Auch in HNSCCs wird die PD-L1-Expression mit Radioresistenz assoziiert. Tumoren mit hoher PD-L1-Expression wiesen nach Strahlentherapie Therapieversagen in 50-70 % der Fälle auf, verglichen mit 20-25 % bei niedriger PD-L1-Expression (180).

#### 4.3.1 Basalexpression von PD-L1

Um zu prüfen, ob der Grad der Radiosensitivität in den untersuchten HNSCC-Zelllinien mit der Expression von PD-L1 korreliert, wurde die PD-L1-Basalexpression in dieser Arbeit auf Gen- und Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass alle RR Zelllinien eine signifikant höhere Basalexpression von PD-L1 aufwiesen, als die RS Zelllinien (**Abbildung 46 und 47**). Die Verwendung von *Taqman*-Sonden und *Exon-spanning* Primern ermöglichte eine spezifische Quantifizierung der Genexpression. Die Genexpression von PD-L1 war in den RR Zelllinien im Mittel um das 6,4x höher als in den RS Zelllinien. Auch die Proteinexpression von PD-L1 war in den RR Zelllinien im Mittel um das 2,7x höher als in den RS Zelllinien, welche alle eine gleich schwache Expression von PD-L1 aufwiesen. PCI 8 war unter den RR Zelllinien diejenige mit dem niedrigsten PD-L1-Gehalt, PCI 52 die mit dem Höchsten. Die differenzielle Expression von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität veranlasste zum Aufstellen der Hypothese, dass PD-L1 eine wichtige zellintrinsische Rolle bei der Vermittlung von Radioresistenz in HNSCC-Zelllinien spielt.

In vielen soliden Tumorarten (269), wie dem Magenkarzinom (270), hepatozellulären Karzinom, kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom (271), Nierenkarzinom (272), Ovarialkarzinom (273), Prostatakarzinom (274) und dem Oropharynxkarzinom (275) wird eine hohe PD-L1-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert. Auch Müller und Kollegen beobachteten eine hohe PD-L1-Expression in 43 % der HNSCCs von 293 Patienten und stellten eine starke Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben fest (252). Für den therapeutischen Einsatz von der PD-1/PD-L1-Immunchekpoint-Blockade stellt PD-L1 aber ein umso besseres Ziel dar.

Viele Forscher beschäftigen sich deshalb derzeit mit der immunmodulatorischen Funktion der PD-1/PD-L1-Interaktion. Klinische Studien an Patienten mit R/M HNSCCs, die keine



Verbesserung nach einer platinbasierten Chemotherapie zeigten, zeigten wiederum beeindruckendes Ansprechen auf eine PD-1-Antikörper-Immuntherapie mit Nivolumab oder Pembrolizumab (9,10). Trotzdem gibt es immer noch Patienten, die nicht von dieser Therapieform profitieren oder auf die Blockade von Immuncheckpoints sogar mit einer Hyperprogression des Tumors reagieren (11,276). Die Gründe hierfür werden immer noch eruiert. Immer mehr Ergebnisse deuten darauf hin, dass PD-L1 dem Tumor zellintrinsic Funktionen vermittelt, die mit aggressiveren Tumoreigenschaften assoziiert sind und einer Behandlung entgegenwirken. Welchen Einfluss die Bestrahlung auf die Regulation von PD-L1 nimmt und welche Unterschiede in den molekularen Mechanismen zwischen RR und RS Zelllinien bestehen, wird derzeit untersucht. Auch wie die zelluläre Lokalisation Funktionen von PD-L1 beeinflusst ist noch unklar. Zelluläre Regulationsmechanismen von PD-L1, vor allem in HNSCCs, wurden bisher nur selten untersucht (277). Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass PD-L1 in Abwesenheit von PD-1 intrinsische Signale aktiviert, die erhebliche Auswirkungen auf die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen haben (246).

Die Veröffentlichung von Ock und Kollegen, die in Patienten mit HNSCCs einen Zusammenhang zwischen PD-L1 und EMT beschrieben (251), veranlasste dazu in dieser Arbeit bekannte EMT Marker wie das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin und Vimentin, ein zytoskeletales Intermediärfilament (278) zu untersuchen. Bei einer näheren Charakterisierung der verwendeten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass RR Zelllinien mit hoher PD-L1-Expression den mesenchymalen Marker Vimentin, aber kein E-Cadherin exprimieren. Die RS Zelllinien hingegen mit niedriger PD-L1-Basalexpression exprimierten den epithelialen Marker E-Cadherin, aber kein Vimentin (**Abbildung 51**). Diese Beobachtung deutete auch hier stark auf einen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und EMT hin.

#### **4.3.2 PD-L1-Expression nach Radiatio**

Es gibt fast keine Daten über den PD-L1-Status von Patienten im Verlaufe der Therapie. Meist liegen nur Biopsien vom Zeitpunkt der Erstdiagnose vor. Nach der Therapie sind selten Daten über die Zusammensetzung des Tumorgewebes vorhanden. Auch ob sich der PD-L1-Status infolge der Therapie ändert, ist kaum dokumentiert (279–281). Die Strahlentherapie hat als Stimulus für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zur Verbesserung der Sensitivität gegenüber der Krebsimmuntherapie an Interesse gewonnen (182). Die zellulären Interaktionen von PD-L1 in Tumorzellen hingegen stehen selten im Fokus der Krebstherapie



(277). Die Frage, wie die Expression von PD-L1 und die damit verbundenen Signalwege in Tumorzellen während oder nach der Bestrahlung interferieren, ist nach wie vor ungeklärt.

Daher sollte in dieser Arbeit zunächst geprüft werden, ob die Bestrahlung Einfluss auf die PD-L1-Proteinexpression in den untersuchten HNSCC-Zelllinien nimmt (**Abbildung 50**). 24 Std nach der Bestrahlung mit 4 Gy und 8 Gy war noch kein signifikanter Effekt zu beobachten. Doch 96 Std nach der Bestrahlung zeigten alle drei RR Zelllinien in der WB-Analyse einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der PD-L1-Gesamt-Proteinexpression um das 3-4x (**Abbildung 50**). Diese Beobachtung bestätigte die Hypothese, dass PD-L1 eine Rolle für die Vermittlung von Radioresistenz spielt.

Dass Bestrahlung die Expression von Immuncheckpoint-Liganden, wie PD-L1, sowohl in Tumorzellen als auch Immunzellen in der Tumorumgebung moduliert, wurde auch in der Literatur beschrieben (282,283). Bestrahlung schafft durch die Schädigung des Gewebes ein inflammatorisches Milieu. Mitunter die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , begünstigt die Induktion der PD-L1-Expression (107).

#### **4.3.3 Synergie zwischen Strahlentherapie und Immuncheckpoint-Blockade**

Eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern, die die PD-1/PD-L1-Achse blockieren, wurden bereits in klinischen Studien getestet (284–287), einige auch in HNSCCs (9,288). Dovedi und Kollegen beschäftigten sich näher mit den Wechselwirkungen zwischen Strahlentherapie und Antikörpertherapien, welche die PD-1/PD-L1-Achse blockieren. Diese Kombinationstherapie konnte in murinen Darm- und Mammakarzinom-Modellen eine effiziente CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort generieren, die das lokale Tumorstadium inhibierte (181).

Darüber hinaus unterstützen präklinische und klinische Daten die potenzielle immunologische Synergie von Bestrahlung und Immuncheckpoint-Blockade. Deng und Kollegen beschrieben eine Verringerung der lokalen Anhäufung von tumorinfiltrierenden MDSCs in Mäusen. Eine signifikant verbesserte lokale Immunantwort wurde erzielt, wenn die Bestrahlung in Mausmodellen von Brust- und Darmkrebs mit einer anti-PD-L1-Antikörper-Behandlung kombiniert wurde (289). Die synergistische Wirkung der Strahlen- und Immuntherapie wurde auch bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (NSCLC) beobachtet (290). Aktuelle Daten von Qin und Kolleg zeigten, dass eine Strahlentherapie in Kombination mit einer PD-L1-Inhibition zu einem vollständigen lokalen und abkopalen Ansprechen beim refraktären Hodgkin-Lymphom führte (291).

## 4.4 Stabilisierung von PD-L1

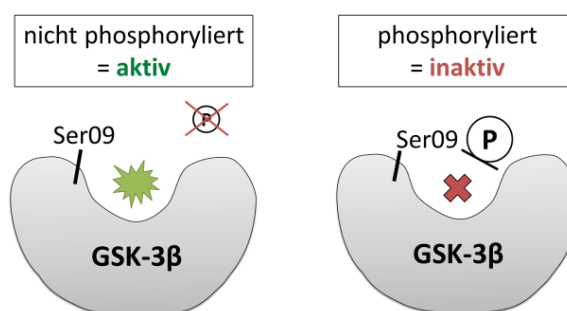
Ob es sich bei der durch Bestrahlung bedingten Erhöhung der PD-L1-Expression in RR Zelllinien (**Abb. 50**) um eine Stabilisierung von PD-L1 handelte sollte näher untersucht werden.

### 4.4.1 Glykosylierung von PD-L1

Der Literatur zufolge ergaben Proteinanalysen von PD-L1 ein Molekulargewicht 33,275 kDa (104). Daher würde man auch in der WB-Analyse PD-L1 auf Höhe der 33 kDa Bande erwarten. Tatsächlich jedoch stellt sich PD-L1, in den hier untersuchten HNSCC-Zelllinien, in der Regel als Doppelbande dar, mit dem Hauptanteil von PD-L1 bei 50 kDa und einem geringeren Anteil von PD-L1 mit einem Molekulargewicht von 42 kDa (deutlich zu sehen in **Abbildung 61**). Behandlungsbedingt, vor allem nach PD-L1-Überexpression, wurden auch Banden auf Höhe von 60 kDa und 33 kDa detektiert (**Abbildung 89**). Hier handelte es sich vermutlich nicht um unspezifische Bindungen des Antikörpers. Im Allgemeinen trifft diese Beobachtung nicht nur auf die hier untersuchten Zelllinien sondern auch auf andere zu. Grund dafür sind posttranslationale Modifikationen des Proteins (105). Li und Kollegen (277) beschrieben ausführlich die Glykosylierung von PD-L1 als Grund für die Zunahme des Molekulargewichts. Abhängig davon, ob PD-L1 glykosyliert ist oder nicht, liegt es in einem stabilen oder instabilen Zustand vor. Nur auf nicht-glykosyliertes PD-L1 kann eine Phosphatgruppe übertragen werden, die zu Ubiquitinylierung und letztendlich zum Abbau von PD-L1 im Proteasom führt. Glykosylierung schützt also PD-L1 vor der Markierung für eine Degradation.

### 4.4.2 GSK-3 $\beta$ -Aktivität

Überträger dieser Phosphatgruppe kann GSK-3 $\beta$  sein. GSK-3 $\beta$  hat eine aktive Einheit, die in einer Vertiefung liegt. Im aktiven, nicht-phosphorylierten Zustand, kann GSK-3 $\beta$  eine Phosphatgruppe auf PD-L1 übertragen und durch Rekrutierung von  $\beta$ -TrCP die Degradation von PD-L1 veranlassen. Hat GSK-3 $\beta$  allerdings an die Aminosäure Serin09 (Ser09) eine Phosphatgruppe gebunden, wird diese aktive Einheit dadurch blockiert und unzugänglich. GSK-3 $\beta$  wird also durch Phosphorylierung inaktiviert. Dieses Prinzip wird in **Abb.87** dargestellt.



**Abbildung 87** Schematische Darstellung von GSK-3 $\beta$  im aktiven und inaktiven Zustand.

GSK-3 $\beta$  ist für die Phosphorylierung vieler Substrate zuständig, die infolge dessen meist inaktiviert und/oder im Proteasom degradiert werden. Ein Anstieg der inaktiven Form von GSK-3 $\beta$  wird auch bei neoplastischen Veränderungen und dem Wachstum beim Mammakarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Haut beobachtet (220,292,293). Bei HNSCCs scheint die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  ebenfalls eine tumorfördernde Wirkung zu haben (292,294).

#### 4.4.3 PD-L1-Stabilisierung in RR HNSCC-Zelllinien durch Inaktivierung von GSK-3 $\beta$

In den verwendeten HNSCC-Zelllinien wurde der Aktivierungszustand von GSK-3 $\beta$  vor und nach der Bestrahlung mit den Dosen 4 Gy und 8 Gy bestimmt. Dadurch sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, ob die höhere PD-L1-Proteinexpression in der RR Zelllinien durch die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  bedingt war.

Während die Basalexpression von GSK-3 $\beta$  in RS (nicht gezeigt) und RR Zelllinien nach der Bestrahlung zunächst unverändert blieb, zeigte sich ausschließlich in den RR Zelllinien 96 Std nach Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  an Ser09 (**Abbildung 67**). Damit konnte ausschließlich in den RR Zelllinien die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  nachgewiesen werden, die eine Markierung von PD-L1 für den proteasomalen Abbau in diesen Zellen verhinderte und damit PD-L1 indirekt stabilisierte.

Um den Zusammenhang von GSK-3 $\beta$  und der PD-L1-Expression weiter zu vertiefen, wurde GSK-3 $\beta$  mit dem spezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitor BIO und dem unspezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitor Lithiumchlorid blockiert. Beide GSK-3 $\beta$  Inhibitoren bewirkten eine Zunahme der PD-L1-Expression (**Abbildung 68**). Damit konnte also GSK-3 $\beta$  in direkten Zusammenhang mit der PD-L1-Expression gebracht werden.

Eine Ko-Immunpräzipitation mittels MACS Technologie konnte außerdem noch die Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1 nachweisen. Dazu wurden magnetische Beads mit Capture-Antikörpern gegen GSK-3 $\beta$  beschichtet. Aus dem Zell-Lysat wurde GSK-3 $\beta$  zusammen mit dessen direkten Bindungspartnern isoliert. Mittels WB-Analyse konnte in diesem Isolat PD-L-1 nachgewiesen und somit als direkter Bindungspartner von GSK 3 $\beta$  bestätigt werden. In allen drei RR Zelllinien zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Interaktion zwischen GSK-3 $\beta$  und PD-L1 nach der Bestrahlung mit 4 Gy und 8 Gy (**Abbildung 69**).

#### 4.4.4 PD-L1-Stabilisierung in RS HNSCC-Zelllinien durch Inaktivierung von GSK-3 $\beta$

Die Expressionsänderung von PD-L1 in RS Zelllinien wurde in diesem experimentellen Setup nicht gezeigt. Wenn in RS Zelllinien 96 Stunden nach Bestrahlung mittels WB-Analyse ein Anstieg in der PD-L1-Expression nachgewiesen werden kann, liegt der Grund für diese Beobachtung vermutlich nicht in der induzierten Stabilisierung von PD-L1 in resistenteren Zellen, wie es für die RR Zelllinien beschrieben wurde, sondern vielmehr im Selektionsvorteil bereits PD-L1-positiver Zellen gegenüber Bestrahlung. Dies wurde deutlich in **Abbildung 62** gezeigt, in der für die RS Zelllinien eine relative Zunahme PD-L1-positiver Zellen infolge der Bestrahlung beschrieben wurde.

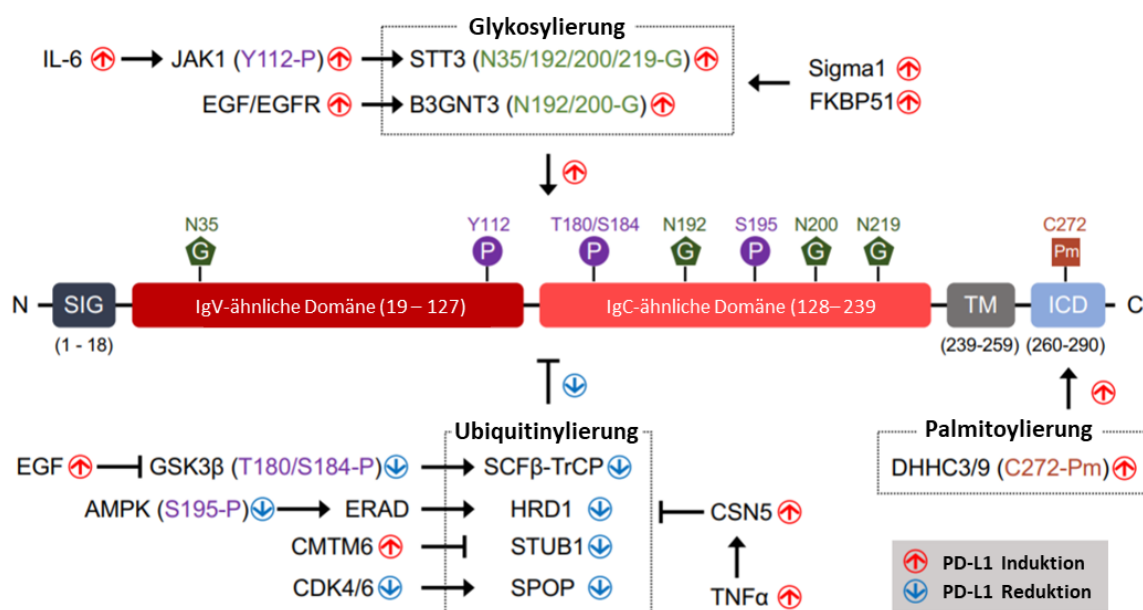
Der FACS-Apoptose-Assay in **Abbildung 49**, bei dem der Einfluss der Bestrahlung auf die Induktion von Apoptose genauer beschrieben wurde, zeigte, dass bereits 24 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy ein deutlicher Anteil der RS Zelllinien Apoptose induzierte. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass in den RS Zelllinien eine rasche Selektion stattfindet. Eine Beobachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop zeigte bereits 48 Std nach der Bestrahlung ein wahrnehmbares Ablösen adhärenter Zellen aus dem Zellverband. 96 Std nach der Bestrahlung wäre folglich bereits ein Großteil der Zellen degradiert worden und für eine Proteinanalyse nicht mehr vorhanden gewesen. Eine Darstellung der PD-L1-Expression RS Zelllinien 96 Std nach der Bestrahlung hätte an dieser Stelle sehr wahrscheinlich zu einer Fehlinterpretation geführt.

Der Nachweis einer Stabilisierung von PD-L1 in den RR Zelllinien infolge der Bestrahlung konnte allerdings die Hypothese, dass PD-L1 eine Rolle bei der Vermittlung von Radioresistenz spielt, weiter bestätigen.

#### 4.4.5 Alternative Mechanismen zu Stabilisierung von PD-L1

Ob neben der Stabilisierung von PD-L1 in den untersuchten RR Zelllinien auch eine *de novo* Synthese von PD-L1 stattfindet wurde hier nicht untersucht, könnte aber in zukünftigen Folgeexperimenten, unter Verwendung des Translations-Inhibitors Cycloheximid (295), geprüft werden. Erste Ergebnisse einer qPCR-Analyse (nicht gezeigt) lassen auch auf eine teilweise Neusynthese von PD-L1 infolge der Bestrahlung schließen. Doch bereits die Stabilisierung von PD-L1 durch Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  kann einen intrinsischen Überlebensvorteil bieten, der die Proliferation von HNSCC-Zellen erleichtert.

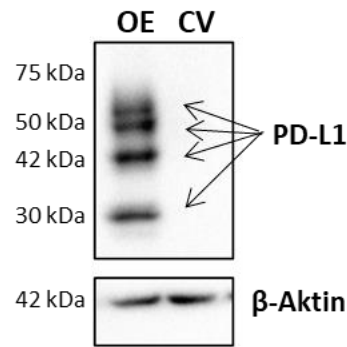
Glykosylierungen sind generell schwer zu untersuchen, doch in der Immunonkologie gewinnen sie immer mehr an Interesse. Denn nicht nur die alleinige Präsenz eines Proteins ist entscheidend über dessen Funktion, sondern auch dessen posttranslationale Modifikation. Diese findet hauptsächlich am endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat statt und ist entscheidend für Proteinfaltung, Lokalisation, Interaktion mit anderen Proteinen, Enzymaktivität und Stabilität des Proteins. **Abbildung 88** aus der Veröffentlichung von Cha und Kollegen zeigt übersichtlich die derzeit bekannten posttranslationalen Modifikationen von PD-L1 (230).



**Abbildung 88** Posttranslationale Modifikationen von PD-L1. Modifiziert nach (230).

*In vitro* und in Mausmodellen konnten Li und Kollegen zeigen, dass die immunsuppressive Wirkung von PD-L1 im triple-negativen Mammakarzinom nur gegeben war, wenn PD-L1 glykosyliert vorlag, da die Glykosylierung Voraussetzung für die Interaktion von PD-L1 mit dem Rezeptor PD-1 ist. Für die immunsuppressive Wirkung von PD-L1 ist daher nicht allein die Quantität, sondern auch die Qualität des Proteins entscheidend (277). Unterschiedliche Modifikationen von PD-L1 könnten auch die zellintrinsic Funktionen von PD-L1 beeinflussen. Auch diese Fragestellung könnte in Zukunft näher untersucht werden.

Eine Dephosphorylierung und Deglykosylierung mit alkalischer Phosphatase sowie PNGase F oder Endo H (296) könnte auch näheren Aufschluss darüber geben, welche posttranslationalen Modifikationen in den hier verwendeten Zelllinien stattfinden (**Abbildung 89**).



**Abbildung 89** PD-L1 Detektion im WB nach PD-L1-Überexpression (OE) in der RS Zelllinie PCI 13 mit niedriger Basalexpression. Eine massive PD-L1 OE führte neben den üblichen 50 und 42 kDa Banden ebenfalls zur Detektion von PD-L1-Banden auf Höhe von 30 kDa und 60 kDa. Teilweise wurden auch Banden auf Höhe von 70 kDa wurden beobachtet. Transfektionskontrolle (CV).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die PD-L1-Expression wird bekanntlich über EGFR- und IFN- $\gamma$  Signaltransduktion induziert (297). In den von Li und Kollegen untersuchten triple-negativen Mammakarzinomzellen konnte vor allem die Stimulation mit EGF die Membranexpression von glykosyliertem PD-L1 induzieren. Eine Inhibition des EGF-Rezeptors zeigte im Mausmodell einer synergistisch Wirkung zur PD-1 Immuncheckpoint-Blockade (277). Der genaue Mechanismus von der Induktion durch IFN- $\gamma$  ist noch nicht bekannt. IFN- $\gamma$  scheint PD-L1 aber im Gegensatz zu EGF auf Transkriptionsebene zu induzieren. Auch TNF- $\alpha$ , ein Zytokin das in chronisch inflammatorischen Tumormilieu präsent ist, kann eine Stabilisierung von PD-L1 vermitteln. TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen sezerniert. Über den TNF-Rezeptor wird im Mammakarzinom der NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert. Infolgedessen wird die Expression von CSN5 induziert, einem Ubiquitinylierungs-Enzym, das die Stabilisierung von PD-L1 fördert (236). Kürzlich wurde auch der PD-L1-Stabilisator CMTM6 identifiziert (264). In HNSCCs soll CMTM6 somit für die Vermittlung von Stammzeleigenschaften und der Abschwächung der Antitumor-Antwort verantwortlich sein (298). Ob in den untersuchten HNSCC-Zelllinien neben der Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  auch andere Regulationsmechanismen für die Stabilisierung von PD-L1 verantwortlich sind, wäre für die Zukunft auch eine interessante Fragestellung (105).

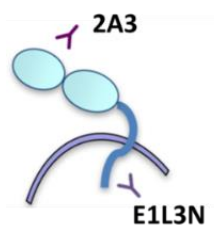
## 4.5 Die zelluläre Lokalisation von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien

Bis heute ist nicht geklärt, weshalb eine PD-L1-Antikörpertherapie mit Nivolumab oder Pembrolizumab bei einigen Patienten zu einer Remission des Tumors führt, während bei anderen Patienten ein Ansprechen des Karzinoms auf die Therapie ausbleibt. PD-L1 ist bekannt als membranständiges Protein, das durch seine Lokalisation an der Membran immunregulatorische Eigenschaften besitzt. Doch auch durch intrazellulär exprimiertes PD-L1 können Signalwege reguliert werden, die Radioresistenz oder andere tumorassoziierte Eigenschaften fördern. Da eine Lokalisation von PD-L1 an der Membran entscheidend für die Wirksamkeit der Antikörper-Therapie ist, wurde hier die Frage geklärt, ob die verwendeten RS und RR Zelllinien grundsätzliche Unterschiede in der zellulären Lokalisation von PD-L1 aufweisen. Es wurde die Lokalisation von PD-L1 in verschiedenen Zellkompartimenten näher untersucht. Auch der Einfluss der Strahlentherapie auf die zelluläre Lokalisation von PD-L1 wurde analysiert.

### 4.5.1 PD-L1-Membranexpression

Mittels FACS-Analyse wurde zunächst die PD-L1-Expression an der Membran bestimmt. RS Zelllinien, die ohnehin eine niedrige Gesamtexpression von PD-L1 auswiesen, zeigten auch eine sehr geringere PD-L1-Basalexpression an ihrer Membran. Diese unterschied sich kaum von der Isotyp-Kontrolle. RR Zelllinien hingegen wiesen eine hohe PD-L1-Membranexpression auf, die deutlich höher war als die der RS Zelllinien. Ähnlich wie in der WB-Analyse war PCI 8 die RR Zelllinie mit der niedrigsten PD-L1-Membranexpression und PCI 52 die Zelllinie mit der höchsten (**Abbildung 46-48**).

Es wurde im FACS ausschließlich membranständiges und kein intrazellulär exprimiertes PD-L1 detektiert. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert. Zudem wurde der anti-PD-L1 Antikörperklon 2A3 (BioLegend) verwendet. Anders als der für die WB-Analyse verwendete anti-PD-L1-Antikörper E1L3N (CST) diente der 2A3 FACS-Antikörper ausschließlich zu Detektion von nativem, membrangebundenem PD-L1 (**Tabelle 4** und **Abbildung 90**) (228).



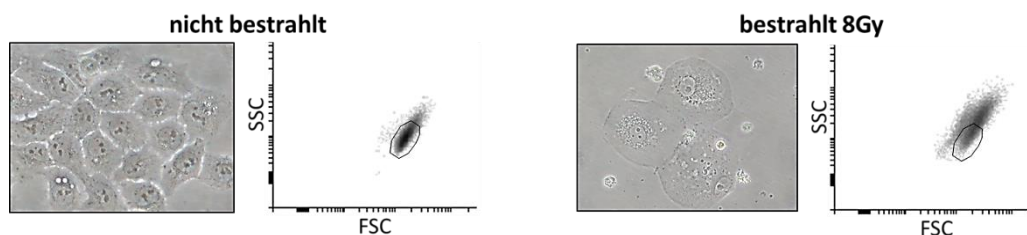
**Abbildung 90** Bindestellen der zwei verwendeten anti-PD-L1-Antikörper. Der FACS-Antikörper 2A3 hat sein Epitop an der extrazellulären Domäne und erkennt ausschließlich natives, membranständiges PD-L1 in voller Länge. Der WB-Antikörper E1L3N hat sein Epitop an der intrazellulären zytosolomatischen Domäne und erkennt sowohl intrazelluläres, als auch membrangebundenes PD-L1. Modifiziert nach Mahoney et al. (228).

Mit hoher PD-L1-Expression an der Membran sollten RR Zelllinien einen größeren suppressiven Einfluss auf das Immunsystem ausüben können als RS Zelllinien und wären so vermutlich ein besonders geeignetes Ziel für eine Immuncheckpoint-Blockade. Es wurde bereits gezeigt, dass die PD-L1-Gesamtexpression in RR Zelllinien infolge der Bestrahlung induziert/stabilisiert wird (**Abb. 50 und 69**). Interessant an dieser Stelle war es aufzuklären, in welchem Zellkompartiment die PD-L1-Expression in den RR Zelllinien zunimmt. Es sollte geprüft werden, ob infolge der Bestrahlung die zelluläre Lokalisation von PD-L1 moduliert wurde und ob grundsätzliche Unterschiede in den untersuchten RS und RR Zelllinien vorlagen.

Um zu überprüfen, ob sich die Membranexpression bedingt durch eine Bestrahlung änderte, wurden alle Zelllinien mit 8 Gy bestrahlt und mittels FACS-Analyse 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung auf ihre PD-L1-Membranexpression untersucht. 72 Std nach der Bestrahlung zeigte sich bei den RS Zelllinien eine Signalzunahme, also eine Zunahme der PD-L1-Expression an der Membran. Die PD-L1-Expression an der Membran von RR Zelllinien hingegen nahm nach der Bestrahlung ab (**Abbildung 52**).

Dieses Ergebnis war überraschend, da man vor allem in den RR Zelllinien nach der Bestrahlung eine Zunahme von PD-L1 an der Membran erwartet hätte, wenn man davon ausginge, dass RR Zelllinien nach der Bestrahlung stärkeren Einfluss auf die Immunregulation nehmen und sich dies in einer erhöhten PD-L1-Expression an der Membran äußern würde. Ob die RR Zelllinien ihre PD-L1-Membranexpression in derselben Weise reduzieren würden, wenn zeitgleich ein Stimulus auf den PD-L1-Liganden ausgeübt wird, beispielsweise durch den rekombinanten PD-1-Rezeptor, bleibt in Zukunft noch zu eruieren.

Dotplots der FACS-Analyse, welche die Zellen durch den sogenannten Forward (FSC) und Sideways Scatter (SSC) nach Größe und Granularität auftrennen, zeigten deutlich, dass die Zellen infolge der Bestrahlung ihre Morphologie änderten. Diese wurden im zeitlichen Verlauf größer und granulärer. **Abbildung 91** zeigt diese Veränderung beispielhaft.



**Abbildung 91** Repräsentative Dotplots zeigen die Verteilung der Zellpopulation nach Größe (FSC) und Granularität (SSC). Hier wird die Zellpopulation der Zelllinie PCI 1 nicht bestrahlt und 72 Std nach der Bestrahlung dargestellt. Es handelt sich um Bildausschnitte gleicher Größe von mikroskopischen Aufnahme in 40x Vergrößerung.



72 Std nach Bestrahlung zeigte sich bei der Isotyp-Kontrolle eine leichte Zunahme der Standardabweichung (SD). Dies implizierte eine Zunahme an unspezifischen Bindungen durch die Behandlung. Um aufgrund von falsch-positiven Signalen keine falschen Schlussfolgerungen über die Signalzunahme an der Membran von RS Zelllinien nach der Bestrahlung zu ziehen, wurden die Änderungen der Signalstärke infolge der Bestrahlung normalisiert und quantifiziert (**Abbildung 53**). Hierfür wurde zunächst aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten der PE-konjugierten Antikörper der Staining Index (SI) berechnet (siehe 2.2.3.4.4), der unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Isotyp-Kontrolle das falsch-positive Signal der Isotyp-Kontrolle vom Signal des PD-L1-Antikörpers subtrahiert. Für die Ermittlung des  $\Delta$  SI, also die Änderung der PD-L1-Expression an der Membran 4, 24, 48 und 72 Std nach Bestrahlung, wurde für jeden Zeitpunkt vom SI der bestrahlten Zellen der SI der nicht-bestrahlten Kontrolle abgezogen. Durch die Berechnung des  $\Delta$  SI konnte schließlich eindeutig bewiesen werden, dass alle drei RS Zelllinien ihre PD-L1-Expression nach der Bestrahlung an der Membran erhöhten.

Die Verringerung der PD-L1-Expression an der Membran bestrahlter RR Zelllinien, die mittels FACS-Analyse gezeigt wurde (**Abbildung 52**), sollte mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Die Idee war, die Zellmembran mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin zu markieren und durch Immunpräzipitation zunächst eine reine Membranfraktion der Zellen zu gewinnen, die im Anschluss mittels WB-Analyse auf ihren PD-L1-Gehalt untersucht wurde. Die RR Zellen wurden 4 und 72 Std nach der Bestrahlung mit 8 Gy geerntet, um frühe und späte Effekte der Bestrahlung detektieren zu können.

Vier Std nach Bestrahlung zeigte sich im Vergleich mit der nicht-bestrahlten Kontrolle noch keine signifikante Änderung der PD-L1-Expression an der Membran. 72 Std nach der Bestrahlung zeigten alle RR Zelllinien wieder eine deutliche Verringerung der PD-L1-Expression an der Membran (**Abbildung 54**).

Diese Methode konnte somit die Beobachtung der FACS-Analyse bestätigen, dass die RR Zelllinien infolge der Bestrahlung ihre Membranexpression verringerten.

Da die PD-L1-Gesamtexpression in den RR Zelllinien infolge der Bestrahlung allerdings nicht abnahm (**Abbildung 50**), wurde vermutet, dass die PD-L1-Expression im Zellinneren zunahm. Ob die Verringerung der Membranexpression einer Internalisierung des membranständigen PD-L1 geschuldet war wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt. Diese Fragestellung könnte in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden. Ein Nachweis über die Zunahme der PD-L1-Expression in Nukleus und Zytoplasma erfolgte schon.

#### 4.5.2 PD-L1-Expression in Nukleus und Zytoplasma

Um zu klären ob, und wie sich die PD-L1-Expression infolge der Bestrahlung im Zellinneren ändert, wurden alle Zelllinien nach der Bestrahlung mit Hilfe eines Zellfraktionierungskits in die Fraktionen Membran, Zytoplasma und Kern aufgetrennt. Die Zelllinien wurden zuvor mit 8 Gy bestrahlt und 48 Std nach der Bestrahlung geerntet (**Abb. 32, 55, 56**). Der 48 Std-Zeitpunkt wurde für die Zellfraktionierung als längste Inkubationszeit nach der Bestrahlung gewählt, da die Ernte mit dem Zellfraktionierungskit auf dem Prinzip der Anwendung verschiedener Puffer beruht. Diese Puffer lösten nacheinander verschiedene Zellbestandteile von den adhären Zellen. Zuerst die löslichen Bestandteile des Zytoplasmas, im zweiten Schritt den Nukleus, im Dritten die Membran. Zuletzt bleibt das Zytoskelett der Zelle übrig. Je länger die Inkubationszeit nach der Bestrahlung andauerte, desto leichter lösten sich die adhären Zellen durch den häufigen Pufferwechsel vorzeitig vom Boden der Zellkulturschale ab. Eine zu lange Inkubationszeit hätte somit eine saubere Auftrennung der Fraktionen erschwert. Der 48 Std-Zeitpunkt nach der Bestrahlung war gut geeignet für die RR Zelllinien und ebenso für die RS Zelllinien, die empfindlicher auf eine Bestrahlung reagierten. Die Verifizierung der isolierten Fraktionen erfolgte mittels WB-Analyse unter der Verwendung verschiedener Marker: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (CST) für den Nachweis der Membran-Fraktion, Lamin A/C (CST) für den Nachweis der Nukleus-Fraktion, GAPDH (Abcam) für den Nachweis der Zytoplasma-Fraktion. Auch die Reinheit der jeweiligen Fraktionen wurde durch Gegenproben sichergestellt (nicht-gezeigt). Die Wahl des 48 Std-Zeitpunkts bot auch den Vorteil, dass die RS Zelllinien zu diesem Zeitpunkt infolge der Bestrahlung noch nicht auf besonders radioresistente Zellen selektioniert wurden.

Die Basalexpression von PD-L1 im Nukleus der RR Zelllinien unterschied sich signifikant von der der RS Zelllinien, denn ausschließlich in RR Zelllinien war eine PD-L1-Expression im Nukleus detektierbar. 48 Std nach der Bestrahlung nahm die PD-L1-Expression im Nukleus der RR Zelllinien ab. Dennoch blieb PD-L1 weiterhin im Nukleus präsent. Die Expression im Nukleus der RS Zelllinien änderte sich nach der Bestrahlung nicht (**Abb. 55**)

Auch im Zytoplasma RS und RR Zelllinien zeigten sich Unterschiede in der PD-L1-Basalexpression. RR Zelllinien hatten eine deutlich höhere PD-L1-Expression im Zytoplasma verglichen mit den RS Zelllinien. 48 Std nach Bestrahlung nahm die PD-L1-Expression im Zytoplasma der RR Zelllinien deutlich zu. Die PD-L1-Expression im Zytoplasma der RS Zelllinien änderte sich nach Bestrahlung nicht (**Abbildung 56**).

Die Experimente zur Bestimmung der genauen Lokalisation von PD-L1 vor und nach Bestrahlung zeigten eindeutig, dass RS und RR Zelllinien grundsätzlich unterschiedlich auf die Bestrahlung reagierten. Nach der Bestrahlung könnten vermutlich unerschiedliche Mechanismen zur Vermittlung von Radioresistenz bzw. Radiosensitivität führen. Die hohe Basalexpression im Zytoplasma der RR Zelllinien, die infolge der Bestrahlung zunimmt, deutet stark auf intrinsische Regulationen hin, die zur Vermittlung von Radioresistenz führt. Ob das die Proliferation begünstigt, oder andere Eigenschaften, wie beispielsweise die Fähigkeit zur Migration, beeinflusst, sollten die nachfolgenden Experimente zeigen.

Ob PD-L1 infolge der Bestrahlung von den HNSCC-Zelllinien auch sezerniert wird, könnte in Zukunft noch untersucht werden. Es gibt inzwischen Hinweise darauf, dass exosomales PD-L1 die Tumorprogression beeinflussen kann (299,300) und das auch in HNSCCs (102). Hierfür könnte in Folgeexperimenten mit dem Zellüberstand nach der Bestrahlung ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt werden, um mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sPD-L1 oder auch sezernierte Zytokine zu detektieren.

In der Literatur wird ebenfalls die behandlungsbedingte Lokalisationsänderung von PD-L1 beschrieben. Ghebeh und Kollegen beschrieben eine zelluläre Lokalisationsänderung von PD-L1 - allerdings nach Doxorubicin Behandlung einem zytostatischen Chemotherapeutikum zur Behandlung maligner Tumoren. Sie beobachteten ebenfalls eine Verringerung der PD-L1-Membranexpression und eine gleichzeitige Zunahme der PD-L1-Kernexpression in Mammakarzinom-Zelllinien. Ein PD-L1-Knockdown führte schließlich noch zu einer Zunahme der Apoptoserate in den Zellen. Daraus lässt sich eine anti-apoptotische Wirkung von PD-L1 herleiten (301).

In Patienten mit Kolorektal- und Prostatakarzinom konnte eine PD-L1-Expression im Nukleus von Vimentin-positiven, zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden (302).

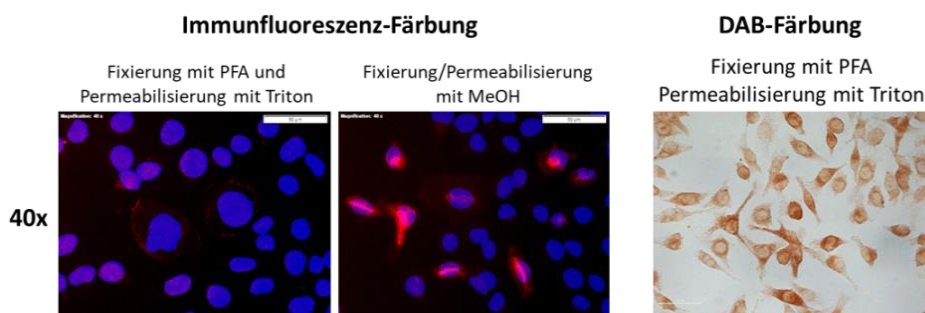
Eine differentielle PD-L1-Lokalisierung wurde auch im Ovarialkarzinom gezeigt. Die Zellen zeigten eine differenzielle Membranexpression oder zytoplasmatische Expression von PD-L1 in Abhängigkeit von den im Tumorgewebe befindlichen Makrophagen (TAM) und deren sezernierte Zytokine. Die Infiltration von TAM trug auch zu einer Induktion der Membranexpression von PD-L1 *in situ* bei (303).

#### 4.5.2.1 PD-L1 in Zytoplasma und Nukleus – Artefakt oder Wirklichkeit

Für einen Review-Artikel von Stovgaard und Kollegen wurden 37 Veröffentlichungen herangezogen die versuchten einen Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und Überleben im Mammakarzinom zu evaluieren. Die Aussage blieb allerdings umstritten. Stovgaard und Kollegen beobachteten, dass die PD-L1-Expression in den Studien stark variierte. Grund hierfür könnte sein, dass bei der IHC Färbung von PD-L1 wieder eine Vielzahl von Strategien angewendet wurde. Diese können bei der Bestimmung des PD-L1-Status vor allem ausschlaggebend sein, wenn zwischen zytoplasmatischer und membranständiger PD-L1-Expression unterschieden werden soll (227).

Laut Polioudaki und Kollegen sollte vor allem die Detektion von PD-L1 und auch anderen Membranproteinen in IHC-Färbungen kritisch hinterfragt werden. Hier wird diskutiert, ob PD-L1 in anderen Zellkompartimenten als der Zellmembran, also im Nukleus und Zytoplasma, Artefakte von IHC-Färbungen darstellen. Sie postulieren, dass nur unter Verwendung milder Detergenzien und starken Fixierungsmethoden sichergestellt werden kann, dass die Lokalisation von PD-L1 und auch anderen Proteinen an der ursprünglichen Lokalisation erhalten bleibt und keine ungewollte Translokation stattfindet (304).

**Abbildung 92** zeigt in drei unterschiedlich durchgeführte PD-L1-Färbungen nach Standardprotokoll. Dieselbe Zelllinie ergab unterschiedliche Färbemuster.



**Abbildung 92** Vergleich unterschiedlicher PD-L1-Färbemethoden an Zelllinie PCI 52. Für alle Färbungen wurde derselbe PD-L1-Antikörper (CST) in identischer Konzentration inkubiert. Dieser wurde mittels Immunfluoreszenz- oder DAB-Färbung detektiert. Um neben membranständigen PD-L1 auch intrazelluläres PD-L1 zu detektieren, wurden die Zellen permeabilisiert. Bei der Verwendung von PFA als Fixationsreagenz erfolgte die Permeabilisierung im Anschluss mit Triton, bei der Verwendung von Methanol (MeOH) erfolgte Fixierung und Permeabilisierung im selben Schritt.

Zur Unterscheidung PD-L1-positiver von PD-L1-negativer Zellen mögen diese Färbemethoden genügen, doch zur Bestimmung der exakten zellulären Lokalisation von PD-L1 müssen Färbemethoden sehr gut etabliert sein. Die Immunfluoreszenz-Färbung mit einer vorherigen Fixierung durch PFA und der Permeabilisierung mit Triton ist im Vergleich zu den anderen Färbungen sehr schwach. Bei der Fixierung mit Methanol (MeOH) scheint sich die Zellmembran vermutlich zusammenzurollen und somit zur Bildung von Artefakten zu neigen. Die DAB-Färbung ergab die Glaubwürdigste unter den drei Färbungen.

Trotzdem wurde hier von einer zellulären Färbung zur Bestimmung der genauen Lokalisation von PD-L1 vor und nach Bestrahlung abgesehen und für die Bestimmung der Lokalisationsänderung andere Methoden angewandt, wie die FACS-Analyse, die Selektion der Membranproteine mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin und die Zellfraktionierung.

#### **4.5.2.2 PD-L1 Transport in den Nukleus**

Der Nukleus ist von einer Hülle umgeben, die aus zwei Phospholipid-Membranen besteht der äußeren und der inneren Kernmembran. Die Kernmembran bietet eine viel stärkere physikalische Barriere als die Zellmembran (305). Die Kernmembran fungiert als eine selektiv durchlässige Barriere, die es Makromolekülen erlaubt, sich über Kernporen (engl.: *nuclear pore complex*, NPC) zwischen Nukleus und Zytoplasma zu bewegen (306).

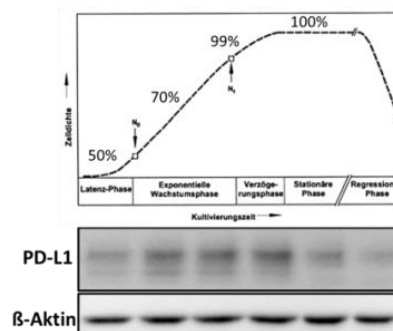
Kleine Proteine können ohne Transportsystem passiv in und aus dem Nukleus diffundieren. Ohne posttranslationale Modifikation hat PD-L1 ein Molekulargewicht von 33,275 kDa. Auch die stabile Form des glykosylierten PD-L1 mit etwa 50 kDa könnte gerade noch in diese Kategorie fallen. Theoretisch wäre daher ein freier Transport von PD-L1 in den Nukleus denkbar. Welche Funktionen PD-L1 im Nukleus erfüllt, ist noch nicht vollständig geklärt. Dennoch gibt es jüngste Veröffentlichungen die beschreiben, dass PD-L1 durch die Stabilisierung von DNA reparaturrelevanten mRNAs indirekt an der DNA-Reparatur beteiligt ist (257).

Größere Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 40-65 kDa benötigen einen aktiven Transport in den Nukleus (306). Dafür ist eine spezifische Signalsequenz nötig, die sogenannte *nuclear localization sequence* (NLS). Der Transport wird unter Beteiligung des kleinen G-Proteins Ran und Transportmolekülen, wie Importin und Exportin, vollzogen. Durch die von Ran katalysierte GTP-Hydrolyse wird die Energie für den Import bereitgestellt. Für den Export aus dem Nukleus in das Zytoplasma benötigen Proteine eine spezifische Exportsequenz, das sogenannte *nuclear export signal* (NES). In Tumoren ist der nukleäre Import und Export oft fehlreguliert (307,308).

### 4.5.3 Nähere Charakterisierung vitaler und apoptotischer Subpopulationen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten unterschiedliche Reaktionen der Zelllinien auf Bestrahlung, abhängig von deren Radiosensitivität. Unabhängig davon, ob die Zelllinien als RS oder RR eingestuft wurden blieben von jeder Zelllinie nach der Bestrahlung Zellen übrig, die keine Apoptose induzierten (**Abbildung 49 und 52**). Auch exprimierten manche Zellen während der Transfektion PD-L1-Stärker über als andere (**Abbildung 62**). Da Zellen immortalisierter Zelllinien alle desselben Ursprungs entstammen, würde man davon ausgehen, dass alle Zellen, die ein identisches Erscheinungsbild haben, auch dieselben Eigenschaften besitzen und daher auf äußere Einflüsse gleich reagieren. Tatsächlich jedoch können sich zwischen den Kulturen ein und derselbe Zelllinie leichte Abweichungen bemerkbar machen. Verantwortlich hierfür können Zelldifferenzierungen sein, die natürlicherweise auftreten, wenn Zellen lange in Kultur gehalten werden. Auch harsche Bedingungen wie beispielsweise ein vorübergehender Nährstoffmangel bei zu schnellem Wachstum, toxische Stoffwechselprodukte und Änderungen des pH-Wertes, die den Selektionsdruck erhöhen, können eine Zelldifferenzierung begünstigen. Selbst standardisierte Zellkultur-Experimente mit definiertem Ernte- oder Färbezeitpunkt spiegeln aber oft auch nur einen bestimmten Augenblick wider. Werden Proteine wie beispielsweise PD-L1 dynamisch exprimiert, kann die Stärke der beobachteten Expression mehr oder weniger zufällig sein.

**Abbildung 93** verdeutlicht, dass die PD-L1-Expression natürlicherweise abhängig von Zellzyklus und Konfluenz variiert. Wenige Stunden nach der Aussaat befinden sich die Zellen in einer Latenzphase, in der sie sich nach dem Passagieren adaptieren. Danach gehen sie in eine exponentielle Wachstumsphase über. Verstärkter Zell-Zell-Kontakt führt zu einer Verzögerungsphase. Aufgrund von Kontakthemmung wird das Wachstum eingestellt. Die Zellen befinden sich in einer stationären Phase bis sie absterben. Die PD-L1-Expression war am höchsten, wenn sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (217).



**Abbildung 93** Leicht variierende PD-L1-Expression abhängig von Zellzyklus und Konfluenz. Repräsentativer WB der Zelllinie PCI 9.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Abbildung der Wachstumsphasen modifiziert nach (217).

Somit könnte „zufällige“ Präsenz oder Abwesenheit von PD-L1 zum Zeitpunkt der Bestrahlung einen Selektions-Vorteil oder -Nachteil mit sich bringen. So gab es auch hier nicht nur zwischen den verschiedenen Zelllinien, sondern selbst innerhalb einer Zelllinie, Abweichungen bei der Regulation von Signalwegen, die steuern, ob und wann eine Zelllinie nach der Bestrahlung Apoptose induziert. Auch im Gewebe ist dieser Effekt vorhanden.

#### 4.5.4 Einfluss der PD-L1-Lokalisation auf das Überleben nach Radiatio

FACS-Analysen, die nach Annexin V/DAPI-Doppelfärbung durchgeführt wurden (**Abbildung 57 und 58**), ermöglichten innerhalb der verwendeten Zelllinien Subpopulationen zu charakterisieren, die sich infolge der Bestrahlung bildeten. Anders als beispielsweise der Zytotoxizitätsmarker YOYO-1, der für *Live Cell Imaging* verwendet wurde, kann eine Annexin V/DAPI-Doppelfärbung zwischen vitalen Zellen, Zellen im frühen und späten Apoptosestadium und nekrotischen Zellen unterscheiden (**Abbildung 28**). Wird diese Färbung mit einer PD-L1-Färbung kombiniert, kann gezeigt werden, ob an der Membran lokalisiertes PD-L1 den Zellen einen Selektionsvorteil nach der Bestrahlung verleiht (**Abbildung 29**).

In diesem Experiment wurde ausschließlich der Apoptosemarker Annexin V und ein PE-konjugierter Antikörper gegen membranständiges PD-L1 ohne DAPI verwendet. So konnte auf Einzelzellbasis ein Bezug zwischen Apoptose und membranständiger PD-L1-Expression hergestellt werden. Durch den Verzicht auf DAPI erschienen jedoch in diesem Experiment die wenigen nekrotischen oder spät-apoptotischen Zellen aufgrund ihrer Annexin V-Negativität fälschlicherweise als vitale Zellen. Dies spielte hier allerdings keine bedeutende Rolle, denn der FACS-Apoptose-Assay in **Abbildung 49** zeigte für die nekrotische Subpopulation im oberen linken Quadranten nach der Bestrahlung für RS und RR Zelllinien einen mittleren Wert von 3,8 % ( $\pm 0,7$  % SD). Dieser Wert war vernachlässigbar gering. Nur weil der Anteil dieser Zellen so gering war, konnte im nachfolgenden Experiment auf eine zusätzliche DAPI-Färbung verzichtet werden.

Die Messung ergab, dass unter den RS Zelllinien diejenigen Zellen vital waren, die 72 Std nach Bestrahlung ihre PD-L1-Expression an der Membran induzierten (**Abbildung 57**). In den RR Zelllinien war das Gegenteil zu beobachten. 72 Std nach der Bestrahlung verringerten die vitalen Zellen unter den RR ihre PD L1-Membranexpression (**Abbildung 58**).

Auch die Änderung des Anteils an PD L1-positiven und -negativen Zellen an der vitalen und apoptotischen Population wurde 4, 24, 48 und 72 Std nach der Bestrahlung berechnet (**Abbildung 59**). In den drei RR Zelllinien nahm 4 bis 72 Std nach der Bestrahlung der Anteil an Zellen zu, die eine PD-L1-Membranexpression aufwiesen, während der Anteil an Zellen mit geringer membranständiger PD-L1-Expression abnahm. Im Gegensatz dazu verringerte sich in den drei RR Zelllinien nach der Bestrahlung der Anteil an Zellen, die eine PD-L1-Membranexpression aufweisen, während der Anteil an Zellen mit membrangebundenem PD-L1 abnahm.

In den von uns untersuchten RR Zelllinien scheint die Lokalisation von PD-L1 auf der Membran keine Rolle für das Überleben zu spielen. Die anfänglich hohe Basalmembran-Expression von PD-L1 nimmt bei allen RR Zelllinien nach der Bestrahlung signifikant ab. Hier scheint die intrazellulär lokalisierte PD-L1 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma, den entscheidenden Überlebensvorteil nach der Bestrahlung zu vermitteln.

Unsere Daten zeigen auch, dass neben einem basalen Einfluss die Bestrahlung selbst einen starken Einfluss auf die PD-L1-Lokalisation hat. Die Literatur zeigt auch, dass die Strahlentherapie die Expression von Immuncheckpoint-Liganden, einschließlich PD-L1, auf der Oberfläche von Tumorzellen und auf Immunzellen im Tumorumfeld moduliert (282,283). Dies könnte auch bedeuten, dass die Strahlentherapie selbst durch Beeinflussung der PD-L1-Expression und/oder Verschiebung von PD-L1 in andere Zellkompartimente die Strahlenempfindlichkeit der Zellen entweder erhöht oder verringert.



## 4.6 Zellintrinsische Funktion von PD-L1

Zur Ermittlung der zellintrinsischen Funktion von PD-L1 wurde der PD-L1-Gehalt in den RS und RR HNSCC-Zelllinien durch Transfektion manipuliert und im Anschluss funktionelle Assays durchgeführt. Der PD-L1-Gehalt wurde in den schwach PD-L1-exprimierenden RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 durch Plasmid-Transfektion überexprimiert. In den PD-L1-hochexprimierenden RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 wurde die PD-L1-Expression durch siRNA-Transfektion verringert. Bei beiden Transfektionen handelte es sich um transiente Transfektionen, deren Effekte nur von begrenzter Dauer sind. Daher wurde für alle Zelllinien bestätigt, dass der Einfluss auf die PD-L1-Expression über die gesamte Dauer des Experiments, d.h. über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen, anhielt (**Abb. 60/61**).

### 4.6.1 Einfluss von PD-L1 auf das Überleben der RS Zelllinien nach Radiatio

Um zu zeigen, dass PD-L1 das Überleben in HNSCC-Zellen nach der Bestrahlung begünstigt, wurde die PD-L1-Expression in den RS Zelllinien durch transiente Plasmid-Transfektion induziert. Anhand der repräsentativen Zelllinie PCI 9 konnte gezeigt werden, dass 10-15 % der Zellen eine sehr starke PD-L1-Expression induzierten. Zu einem frühen (4 Std) und späten Zeitpunkt (72 Std) nach der Bestrahlung wurde der Anteil PD-L1-positiver Zellen evaluiert. Die PD-L1-Expression wurde über eine DAB-Färbung nachgewiesen. 4 Std nach der Bestrahlung gab es noch keine Änderung am Anteil der PD-L1-positiven Zellen in der nicht-bestrahlten Kontrolle (4 %  $\pm$  2 % SD) und den bestrahlten Zellen (8,8 %  $\pm$  2 % SD). 72 Std nach der Bestrahlung war der Anteil PD-L1-positiver Zellen (36,6 %  $\pm$  9,8 % SD) im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (5,4 %  $\pm$  2 % SD) signifikant höher (**Abb. 62**).

Dieses Ergebnis und auch das des *Live Cell Imagings* nach PD-L1-Überexpression (**Abbildung 63**) deuteten unabhängig voneinander darauf hin, dass PD-L1-exprimierende RS Zellen einen Überlebensvorteil nach der Bestrahlung hatten. Hier bot allerdings nicht nur die alleinige Präsenz von PD-L1 den Selektionsvorteil nach der Bestrahlung sondern auch die Lokalisation an der Membran (**Abbildung 57**). In den RR Zelllinien erbrachte membranständiges PD-L1 keinen Selektionsvorteil (**Abbildung 58**). Somit scheinen in RR und RS Zelllinien differenzielle Mechanismen das Überleben der Zelle zu steuern.

#### 4.6.2 Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien

Um die Funktion von PD-L1 für die Proliferation der RR Zelllinien nachzuweisen, wurde die PD-L1-Expression in diesen Zelllinien mittels siRNA-Knockdown herunterreguliert und ein Proliferations-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Std beobachtet. Es zeigte sich eine starke Abnahme der Proliferation in Zellen mit verringertem PD-L1-Gehalt. Die Verdopplungszeit verlangsamt sich signifikant (**Abbildung 64**). PD-L1 begünstigte somit die Proliferation in den RR Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52. Dieser Effekt war allerdings strahlungsunabhängig. Die Stärke der PD-L1-Expression korrelierte nicht mit der Verdopplungszeit, da PCI 52 mit der höchsten PD-L1-Basalexpression die langsamste Proliferationsrate aufwies und PCI 15 mit ebenfalls hohem PD-L1-Gehalt die Schnellste (**Abbildung 42**). Durch die Begünstigung der Proliferation konnte PD-L1 das Überleben von RR HNSCC-Zellen nach der Bestrahlung fördern. Welcher Mechanismus diesen Effekt vermittelt, sollte näher untersucht werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg bei mehr als 90 % der HNSCCs weit verbreitet ist und somit ein wichtiger Signalweg in der Pathogenese ist (309,310). Er ist an einer Vielzahl von onkogenen Prozesse beteiligt, zu denen zählen Zellproliferation, Wachstum, Überleben, Apoptose, EMT, Motilität, Metastasierung und Angiogenese (309,310). In den letzten Jahren haben die Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und der PD-L1-Expression zugenommen (237,246,311,312).

In der Tumorzelle führt eine PD1/PD-L1-Interaktion zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, wodurch die tumorintrinsic Glykolyse beschleunigt wird, der Tumorzelle anti-apoptische Signale vermittelt werden und so das Überleben der Zelle verlängert wird. In Untersuchungen an Melanom- und Ovarialkarzinom-Zelllinien, sowie an immuninkompetenten Mäusen führte ein Knockdown der PD-L1-Expression zu einer verringerten Zellproliferation, einer Abschwächung der mTORC1-Aktivität und verstärkter Autophagie (5).

Mittlerweile deuten viele Daten darauf hin, dass PD-L1 auch in Abwesenheit des Rezeptors PD-1 zellintrinsic Signale aktivieren kann, die die Zellproliferation und das Überleben durch die Hemmung der Autophagie und die Aktivierung von mTOR verbessern (246). Studien an Pankreaskarzinomen und Gliomzellen zeigten, dass die PD-L1-Expression durch PTEN über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg reguliert wird. Ein Verlust von PTEN erhöht sowohl die PD-L1-Expression als auch die Proliferation und Invasion von Tumorzellen (311).

#### 4.6.2.1 Einfluss des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs

Eine Ko-Immünpräzipitation mit einem PD-L1-Capture-Antikörper konnte Akt als direkten Bindungspartner von PD-L1 in den RR Zelllinien, aber nicht in den RS, identifizieren (**Abbildung 78**). Diese differenzielle Interaktion von PD-L1 und Akt nahm in den RR Zelllinien nach Bestrahlung noch weiter zu.

Streng genommen weist eine Ko-Immünpräzipitation keine direkte Interaktion von Proteinen nach. Vielmehr weist sie das Vorhandensein von Proteinen in einem Interaktionskomplex nach. Eine direkte Interaktion muss aber nicht ausgeschlossen sein. Um eine direkte Interaktion zu beweisen sind Assays wie der *Proximity Ligation Assay* geeignet, die eine räumliche Nähe der Proteine zueinander im Nanometer-Bereich nachzuweisen. Solche Experimente, auch zum Nachweis anderer Interaktionspartner, sind in der Zukunft geplant.

Akt1 ist ein nachgeschaltetes Molekül des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt/mTOR-Signalwegs, der einen der am stärksten fehlregulierten Signalwege bei Tumorerkrankungen darstellt (313). Er ist an verschiedenen onkogenen Prozessen wie Zellproliferation, Wachstum und Überleben beteiligt (313). Die PI3K-Familie gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und wird in drei Klassen unterteilt, die sich durch unterschiedliche Strukturen und spezifische Substrate auszeichnen (314–316). PI3Ks der Klasse 1A sind heterodimere Proteine, die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit mit drei Isoformen (P110) bestehen (316,317). Nachgeschaltet wird Akt durch PI3K-vermittelte Modulation von Phospholipiden der Zellmembran aktiviert (316,317). Akt wiederum moduliert Proliferation und die Proteinsynthese über die Phosphorylierung von mTOR (311,318). In den letzten Jahren ist PI3K ein beliebtes Target der Krebstherapie geworden. Bislang wurden mehrere Medikamente dafür entwickelt. Einer dieser Wirkstoffe ist Buparlisib (BKM120, NVP-BKM120). Buparlisib ist ein oral verabreichter Pan-Klasse-1-Inhibitor von PI3K, der auf die PI3Ks der Klasse 1A und etwas weniger stark auf die Isoform der Klasse 1B abzielt (311,318). Buparlisib durchläuft derzeit mehrere klinische Studien, darunter auch für HNSCCs. Darüber hinaus hat es bereits vielversprechende anti-proliferative Wirkungen in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt (315). Aufgrund der sich abzeichnenden Hinweise auf den Zusammenhang zwischen PD-L1 und dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob die PI3K-Inhibition die Expression und Funktion von PD-L1 beeinflusst.

Daher wurden die Auswirkungen der Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs durch Buparlisib auf die PD-L1-Expression in den etablierten HNSCC-Zelllinien untersucht.

Bei der Analyse von Signalwegsregulationen wurde großer Wert darauf gelegt, dass verwendete Inhibitoren wirksam aber nicht zu toxisch waren. Ziel war es die Konzentration so zu wählen, dass zwar sichtbare Effekte eintreten, diese aber nicht zu hoch zu wählen, sodass die Behandlung zu einer sofortigen Induktion von Apoptose führte. So wurde, wie auch bei der sorgfältigen Wahl der Bestrahlungsdosis, bei der Bestimmung der inhibitorischen Konzentration von Buparlisib, für jede Zelllinie einzeln das beste Verhältnis aus Wirksamkeit und Toxizität ermittelt (**Abbildung 70**). Um zu beweisen, dass toxische Effekte minimal gehalten wurden, wurde auch ein FACS-Apoptose-Assay zur Ermittlung der einzusetzenden Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt (nicht gezeigt). Nach 72-stündiger Buparlisib-Behandlung zeigten die RS Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit geringer PD-L1-Basalexpression eine Abnahme der vitalen Zellpopulation um bis zu 21,9 %. Die toxischen Effekte waren bei den RR Zellen PCI 8, PCI 15 und PCI 52 mit hoher PD-L1-Expression geringer. Diese zeigten einen Rückgang der vitalen Zellpopulation von nur 13,9 %.

Die Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor Buparlisib führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion/Inhibition der Proliferation (**Abbildung 71**). Auch eine Verringerung der Akt-Aktivität konnte nachgewiesen werden (**Abbildung 72**). Die gleichzeitige Verringerung des PD-L1 Gehalts konnte den Einfluss von Akt/PI3K auf PD-L1 beweisen (**Abbildung 73**). Da die Blockade von PI3K/Akt zu einer Verringerung der PD-L1-Expression führte, wurden vorwiegend die RR mit mittlerer und hoher PD-L1-Expression (**Abbildung 47**) für weitere Analysen verwendet. Eine FACS-Analyse, bei der der PD-L1 Gehalt an der Zellmembran untersucht wurde, zeigte, dass eine Verringerung der Akt-Aktivität auch zu einer signifikanten Abnahme der PD-L1-Expression an der Membran RR Zelllinien führte (**Abbildung 74**). Nach der Inkubation mit Buparlisib erhöhte sich sogar der Anteil an Zellen mit negativer PD-L1-Membranexpression (**Abbildung 75**). Um Signifikanzen zu bestimmen muss der Versuch allerdings wiederholt werden. Dennoch wurde das Experiment mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt, die zum Großteil einheitliche, dosisabhängige Effekte zeigten.

In einer kürzlich durchgeführten randomisierten Phase-II-Studie an Patienten mit platin-refraktärem R/M HNSCCs wurde eine klinisch relevante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, des Gesamtüberlebens und des Ansprechens der Patienten nach Buparlisib- und Paclitaxel-Behandlung im Vergleich zu der mit Placebo und Paclitaxel behandelten Gruppe

(315). Darüber hinaus wurden Buparlisib-vermittelte anti-proliferative Effekte in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet (315).

Im nächsten Schritt wurde geprüft ob Radiatio die durch Buparlisib verursachte Verringerung der PD-L1-Expression abschwächt, zumal in **Abbildung 50** eine strahlungsbedingte Zunahme der PD-L1-Expression beobachtet wurde.

Die Inkubation mit Buparlisib für 72 Std wurde ohne Verzögerung nach der Bestrahlung begonnen. WB-Analysen zeigten trotz Bestrahlung eine Reduktion der PD-L1-Proteinexpression in allen untersuchten Zelllinien. In Zelllinie PCI 8 und PCI 15 war dieser Effekt auch signifikant (**Abbildung 76**). Zur Untersuchung der PD-L1-Expression an der Zellmembran wurden FACS-Analysen nach Buparlisib-Behandlung in Kombination mit Bestrahlung durchgeführt (nicht gezeigt). Die Kombination aus Akt/PI3K-Blockade und Bestrahlung zeigte, wie bei der alleinigen Behandlung mit Buparlisib, eine verminderte PD-L1-Membranexpression. Nur bei Zelllinie PCI 15 ergaben sich keine eindeutigen Effekte auf die Membranexpression und den Anteil der PD-L1-positiven Zellen.

Weil ein PD-L1-Knockdown in **Abbildung 64** einen anti-proliferativen Effekt zeigte, sollte überprüft werden, ob eine PD-L1-Überexpression den anti-proliferativen Effekt von Buparlisib aufheben kann. Für dieses Experiment wurden alle sechs HNSCC-Zelllinien verwendet.

Hier zeigte sich, dass eine PD-L1-Überexpression in den Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 8 die Buparlisib-vermittelte Reduktion der Proliferation aufgehoben wurde. Dies führte zu einer geringeren Verdopplungszeiten im Vergleich zur Transfektions-Kontrolle (**Abbildung 77**). Die Neutralisierung des anti-proliferativen Effekts durch Buparlisib scheint in Zelllinien mit geringerer basaler PD-L1-Expression stärker zu sein. Ein Grund, dass die Wirkung von Buparlisib nicht bei allen Zelllinien in gleicher Weise eintritt, könnte ein stärkerer Einfluss des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs auf die PD-L1-Expression nach Transfektion in PCI 1, PCI 9 und PCI 8 sein. In den Zelllinien PCI 13, PCI 15 und PCI 52 könnten andere onkogene Prozesse eine wichtige Rolle bei der PD-L1-Expression nach der Transfektion spielen (315), weil in den Zelllinien PCI 15 und PCI 52 auch eine Expression von EMT-Markern nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 51**).

### 4.6.3 Einfluss von PD-L1 auf Migration und Invasion

Färbungen von PD-L1 mit DAB zeigten nach der Überexpression von PD-L1 in RS Zelllinien mit geringer PD-L1-Basalexpression, keine einheitliche PD-L1-Expression. Stattdessen waren nur vereinzelte Zellen der Population sehr stark PD-L1-positiv. Erkennbar war dies an der deutlichen Braunfärbung PD-L1-positiver Zellen. Interessant war, dass genau diese Zellen auch eine stark veränderte Morphologie zeigten. Die Zellen mit stark positiver PD-L1-Expression hatten eine auffällig langgestreckte, spindelförmige Gestalt, im Gegensatz zu den mit Leervektor transfizierten Zellen, die eine einheitliche, typisch rundliche Morphologie zeigten, wie es für Epithelzellen üblich ist (**Abbildung 65**). Daher ergab sich der starke Verdacht, dass eine erhöhte PD-L-Expression auch in den verwendeten HNSCC-Zelllinien mit einer EMT in Verbindung gebracht werden kann, zumal in **Abbildung 51** gezeigt werden konnte, dass nur die RR PD-L1 hoch exprimierenden Zelllinien den EMT-Marker Vimentin, aber nicht den Zelladhäsionsmarker E-Cadherin exprimieren.

Dieser Beobachtung wurde nachgegangen und die Migrations- und Invasionsfähigkeit entlang eines chemotaktischen Gradienten abhängig von der PD-L1-Expression geprüft (**Abbildung 66**). Hierfür wurden Sphäroide von jeweils einer HNSCC-Zelllinie mit niedriger (PCI 13) und einer mit hoher PD-L1-Basalexpression (PCI 52) generiert. Der PD-L1-Gehalt dieser Zelllinien wurde durch transiente Transfektion in PCI 13 überexprimiert und der in PCI 52 herunterreguliert. Diese Zellen wurden mit ihrer jeweiligen Transfektions-Kontrolle verglichen. Zellen mit der Fähigkeit zur Migration sollten durch eine permeable Membran zum Ort der höheren Nährstoffkonzentration wandern. Wurde die Invasionsfähigkeit der Zellen getestet mussten diese zuvor durch eine spezielle Beschichtung wandern, um zu den Poren zu gelangen. Die Beschichtung trägt den Handelsnamen Matrigel®. Matrigel® wurde aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom isoliert und besteht aus Matrixbestandteilen, die sich aus etwa 60 % aus Laminin, 30 % Kollagen Typ IV und 8 % Nidogen zusammensetzten. Diese Zusammensetzung imitiert eine Basallamina (319).

PCI 13 zeigte nach PD-L1-Überexpression eine fast doppelt so hohe Migrationsfähigkeit und eine mehr als doppelt so hohe Invasionsfähigkeit. Der PD-L1 in PCI 52 zeigte konträr den Verlust der Migrationsfähigkeit um knapp die Hälfte und einen Verlust der Invasionsfähigkeit um mehr als die Hälfte. Alle beobachteten Effekte waren signifikant (**Abbildung 66**).

#### **4.6.3.1 Einfluss von PD-L1 auf die Ausrichtung des Zytoskeletts**

Die mit EMT-assoziierten Marker Vimentin und E-Cadherin wurden bereits in adhärenen Zellen in 2D-Zellkultur vor und nach Bestrahlung untersucht (**Abbildung 51**). Diese Marker wurden erneut mit Zellen in 3D-Kultur getestet und um den mesenchymalen Marker N-Cadherin ergänzt (**Abbildung 79**). Hier wurde nicht die strahlungs-abhängige Expression der EMT-Marker untersucht, sondern eine PD-L1-abhängige Expression dieser Marker.

Dazu wurde der PD-L1-Gehalt in Sphäroiden der Zelllinie PCI 13 überexprimiert und in denen von Zelllinie PCI 8 und PCI 52 herunterreguliert. Die transfizierten Zellen wurden mit ihrer jeweiligen Transfektions-Kontrolle verglichen. Die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin in 3D-Sphäroiden zeigte eine Abhängigkeit zwischen dem PD-L1-Gehalt und den Markern N-Cadherin- und Vimentin. Die E-Cadherin-Expression änderte sich nach PD-L1-Knockdown bzw. Überexpression nicht (**Abbildung 79**). Die Expression des Markers E-Cadherin variierte in Zelllinie PCI 8 abhängig davon ob die Zellen in 2D oder 3D kultiviert wurden. Eine verstärkte Expression des Zelladhäsionsmarkers E-Cadherin durch erhöhten Zell-Kontakt ist denkbar.

Um die PD-L1-abhängige Migration näher zu untersuchen wurde ein Migrations-Assay auf unterschiedlichen Matrixkomponenten durchgeführt (Fibronectin, Kollagen Typ I und Matrigel®). Eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin- diente als Kontrolle, da hier nur eine Integrin-unabhängige, unspezifische Adhäsion möglich war (**Abbildung 80**). Der siRNA-Knockdown in Zelllinie PCI 52 zeigte im Vergleich zur Poly-L-Lysin-Beschichtung keine signifikante Veränderung ihrer der Migrationsfähigkeit auf unterschiedlichen Matrixkomponenten. Insgesamt war die Migration jedoch signifikant geringer als in den Kontrollen. Der siRNA-Knockdown in den mäßig PD-L1-exprimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 8 führte zum Zelltod auf der Poly-Lysin-Beschichtung, was eine Migration verhinderte. Vermutlich ist die Zelllinie PCI 8 in einem Zustand einer nicht vollständig abgeschlossenen Transition und benötigt daher extrazelluläre Matrix als Überlebenssignal, wenn die PD-L1-Expression gering ist. Sobald Matrixbestandteile vorhanden waren, adhärten und migrierten die Zellen von PCI 8. Die Flächenausbreitung war allerdings deutlich geringer als bei den Transfektions-Kontrollen. Die PD-L1-Überexpression in PD-L1-hochexprimierenden Sphäroiden von Zelllinie PCI 52 zeigte keinen Einfluss auf die Flächenausbreitung. Dagegen führte die PD-L1-Überexpression in den PD-L1-moderat exprimierenden Sphäroiden der Zelllinie PCI 8 auf der Kollagen Typ I Beschichtung zu einer 10x Erhöhung der

Flächenausbreitung. Am interessantesten war, dass Sphäroiden der PD-L1-niedrig-exprimierenden Zelllinie PCI 13 nach PD-L1-Überexpression eine signifikante Zunahme der Flächenausbreitung auf Kollagen Typ I und Matrigel® zeigte. Diese Beobachtung lässt auf eine PD-L1 abhängige Regulation bestimmter Integrin-Typen schließen, was in Zukunft näher untersucht werden soll.

Sobald PD-L1 überexprimiert war, entwickelten die Zelllinien PCI 13 und PCI 8 auf fibrillären Matrices eine Fähigkeit zur Flächenausbreitung, die auf Fibronectin nicht gegeben war. Fibronectin, mit einer Masse von ca. 250 kDA, spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration (315). Dies zeigte sich nicht für Zelllinie PCI 52, die sich auf allen Oberflächen weniger stark ausbreitete. Ein höherer PD-L1-Gehalt schien für diese Zelllinie keinen Vorteil zu bieten. Um sicherzustellen, dass es sich bei der beobachteten Flächenausbreitung tatsächlich um Migration handelt und nicht durch eine Ausbreitung bedingt durch Zellproliferation, wurden Experimente durchgeführt, bei denen Sphäroiden unter normalen Kulturbedingungen die Möglichkeit zur Adhäsion und ungehinderter Proliferation geboten wurde. Mittels MTT-Assay wurde die Anzahl der Zellen über einen längeren Zeitraum zu definierten Zeitabständen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Zellen nach der Sphäroidbildung in ihrer Proliferation gestört waren (nicht gezeigt). Eine Bestimmung der Zellzahl mittels MTT in Sphäroiden gestaltete sich schwierig. Daher sollte dieses Experiment ggf. unter der Verwendung von Resazurin wiederholt werden.

Aufgrund der überwiegend unabhängigen Flächenausbreitung auf verschiedenen Matrixkomponenten wurde vermutet, dass es eine Verbindung zwischen PD-L1 und Proteinen, die an der Konstruktion oder Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind, gibt. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine breit-gefächerte Genexpressionsanalyse Zellmotilitäts-relevanter Gene durchgeführt (**Abbildung 81**).

Exemplarisch für diese Untersuchungen wurden die niedrig und hoch PD-L1-exprimierenden Zelllinien PCI 13 und PCI 52 verwendet. In Sphäroiden der Zelllinie PCI 13 wurde PD-L1 überexprimiert und in Sphäroiden der Zelllinie PCI 52 herunterreguliert.

Die Expression von RHO, das für ein Mitglied der kleinen Familie der Rho-GTPasen kodiert, war bei PCI 52 nach PD-L1-Knockdown verringert, während RAC2, das für ein Protein derselben Familie kodiert, nach PD-L1-Überexpression von Zelllinie PCI 13 erhöht war. Auch die Expression der GTPasen Rho und Rac2, für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung, änderte sich nach Modulation des PD-L1 Gehalts. Physiologisch



reguliert Rho die Bildung von Stressfasern. Rac-GTPasen sind für die Bildung von Lamellipodien und Membranausstülpungen verantwortlich (315). Bei malignen Erkrankungen stehen Rho und Rac im Verdacht, die EMT zu beeinflussen, indem sie den Abbau oder die Stabilisierung von Cadherinen regulieren.

Nach der Modulation der PD-L1-Expression wurden mehrere Gene, die mit der Organisation des Zytoskeletts zusammenhängen, beeinträchtigt, darunter RAC2, ARGHDIA, PAK4, ITGA4, MMP9 und RHO. Zelllinie PCI 13 zeigte eine Induktion der Genexpression von RAC2, welches Mitglied der kleinen GTPase-Familie ist. PAK4, eine Serin/Threonin-Kinase, bekannt als Effektorprotein der kleinen Rho-GTPasen, wurde herunterreguliert. PCI 52 zeigte eine Induktion der Genexpression von ARGHDIA, einem Modulator von RHO-GTPasen sowie PAK4. Zusätzlich zeigten die Daten eine Reduktion von ITGA4, MMP9 und RHO, welche mit Zellmotilität assoziiert sind (**Abbildung 81**).

Xu et al. konnten eine erhöhte Migrationsfähigkeit in Margenkarzinom-Zelllinien in 2D-Zellkultur nachweisen. PD-L1 wurde mittels TGF $\beta$ 1 Stimulation überexprimiert. Überexprimierte Zellen invadierten signifikant stärker durch die Matrigel® als die Kontrolle. Eine Zunahme der Flächenausbreitung zeigte sich auch im sogenannten *scratch assay*. Dieser ist allerdings für die Arbeit mit Sphäroiden ungeeignet (316).

Zusammenfassend zeigte sich PD-L1 als wichtiger Faktor bei der Migration und Invasion der untersuchten HNSCC-Zelllinien. Eine Genexpressionsanalyse von Zellmotilitäts-assoziierten Genen zeigte einen Einfluss von PD-L1 auf die Regulation von Proteinen, die für die Ausbildung des Zytoskeletts essenziell sind. Die genauen Mechanismen sollen in zukünftigen Experimenten weiter aufgeklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von PD-L1 und dessen zellintrinsische Funktionen in HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität näher zu untersuchen, um Therapieversagen zu erklären und Ideen für zukünftige Kombinationstherapien und individualisierte Therapien geben zu können.

Dafür wurde zunächst ein geeignetes Modell etabliert, mit dem die Vermittlung von Radioresistenz im HNSCC näher untersucht werden konnte. Dafür wurden insgesamt sechs HNSCC-Zelllinien unterschiedlicher Radiosensitivität verwendet. Diese zeigten eine differenzielle Expression von PD-L1, wobei Zelllinien mit hoher Radioresistenz auch eine hohe Expression von PD-L1 und EMT-assoziiierter Marker zeigten. Radiatio führte in RR Zelllinien zu einer Stabilisierung von PD-L1 durch die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$ . Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde die Hypothese formuliert, dass PD-L1 in HNSCC-Zelllinien eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Radioresistenz spielt.

Funktionelle Experimente, bei denen der PD-L1-Gehalt der Zellen mittels siRNA-Knockdown oder Plasmid-Überexpression moduliert wurde, zeigten, dass PD-L1 für die Proliferation RR HNSCC-Zelllinien essenziell ist. Ebenfalls wurden Tumor-assoziierte Eigenschaften, wie Migration und Invasion, durch eine erhöhte PD-L1-Expression begünstigt. Eine Genexpressionsanalyse Zellmotilitäts-assoziiierter Gene zudem zeigte auf, dass die Expression von PD-L1 Proteine beeinflusst, die an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt sind. Unterschiedliche Ausbrautungseigenschaften abhängig vom Beschichtungstyp lassen auf eine PD-L1-abhängige Expression unterschiedlicher Integrin-Typen schließen, was in Zukunft näher untersucht werden soll. Da die meisten dieser beobachteten Effekte Strahlungsunabhängig waren, konnte keine direkte Assoziation von PD-L1 mit der Radioresistenz bestätigt werden. Dennoch vermittelt PD-L1 in HNSCC-Zelllinien aggressivere Tumoreigenschaften.

Eine PD-L1-Überexpression in HNSCC-Zelllinien brachte einen Selektionsvorteil nach Bestrahlung, allerdings abhängig von der zellulären Lokalisation von PD-L1. Im Allgemeinen zeigten RS und RR HNSCC-Zelllinien eine differenzielle PD-L1-Lokalisation, die sich durch Radiatio veränderte. RR Zelllinien exprimierten einen Großteil an PD-L1, im Gegensatz zu den RS Zelllinien, in Zytoplasma und Nukleus. RS Zelllinien hingegen exprimierten den

Hauptteil ihrer, ohnehin geringen, PD-L1-Expression an der Zellmembran. Lokalisationsbedingt scheint PD-L1 in RS und RR Zelllinien unterschiedliche Signalwege zu beeinflussen.

Nur in RR Zelllinien konnte eine direkte Interaktion von PD-L1 mit dem Signalwegsregulator Akt nachgewiesen werden, einem nachgeschaltetes Molekül des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, welcher einer der am stärksten fehlregulierten Signalwege bei Tumorerkrankungen darstellt und an verschiedenen onkogenen Prozessen, wie der Zellproliferation, dem Überleben beteiligt ist.

Es gibt immer mehr Hinweise, dass eine hohe PD-L1-Expression mit schlechten Überlebensraten und einem fehlenden Ansprechen des Tumors auf verschiedene Therapieformen assoziiert ist. Die Interaktion des Transmembranproteins PD-L1 und PD-1 führt zu einer Inhibition der T-Zell-vermittelten Antitumor-Antwort. Daher könnten unsere Erkenntnisse über eine mögliche Buparlisib-vermittelte Reduktion PD-L1-Expression - und insbesondere der Reduktion der PD-L1-Membranexpression - einen therapeutischen und prognostischen Einfluss auf den Therapieverlauf von Patienten haben. Aufgrund der Fähigkeit, die PD-L1-Expression auch auf der Membran zu reduzieren, könnte eine Blockade des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs eine gute zusätzliche Therapie für Patienten sein, die nur eingeschränkt auf eine Immuncheckpoint-Therapie ansprechen.

PD-L1 ist zu Recht ein neues und durchaus vielversprechendes Ziel der Krebstherapie, doch vieles ist bisher ungeklärt.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

#### 6.1.1 Abkürzungen ohne wissenschaftlichen Hintergrund

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
engl.	englisch
ggf.	gegebenenfalls
i.d.R.	in der Regel
k.A.	keine Angabe
min.	mindestens
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem
z.B.	Zum Beispiel

#### 6.1.2 Begriffe

AA	Aminosäure
AK	Antikörper
ALDH 1	Aldehyddehydrogenase 1
APAF-1	engl.: <i>apoptotic protease activating factor</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl.: <i>antigen presenting cell</i> )
BER	Basen-Exzisionsreparatur (engl.: <i>base excision repair</i> )
BSA	Bovines Serum Ablumin
CD	Unterscheidungsgruppen (engl.: <i>cluster of differenziation</i> )
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid, cDNA</i> )
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom (engl.: <i>classical Hodgkin lymphoma</i> )
COX	Cyclooxygenase
CST	Cell Signaling Technologies
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	Dendritische Zelle (engl.: <i>dendritic cell</i> )
ddH <sub>2</sub> O	bi-distilliertes Wasser

DLBCL	diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (engl.: <i>diffuse large B-cell lymphoma</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSB	Doppelstrangbruch
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	EGF-Rezeptor
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ention.	entionisiert
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>fluorescence-activated cell scanning</i> )
FADD	engl.: <i>Fas-associated death domain</i>
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administraton
FSC	vorwärts gestreutes Licht (engl.: <i>forward scatter</i> )
GSK	Glycogen Synthase Kinase
Gt	Ziege (engl.: <i>goat</i> )
HCC	hepatozelluläres Karzinom (engl.: <i>hepatocellular carcinoma</i> )
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (engl.: <i>hepatocyte growth factor</i> )
HNSCC	Kopf-Hals-Tumor (engl.: <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> )
HPV	humanes Papillomvirus
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration (engl.: <i>inhibitory concentration</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
KD	Knockdown
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl.: <i>loss of heterocycosity</i> )
MACS	engl.: <i>magnetic-activated cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper

MDR	engl.: <i>multidrug resistance protein</i>
MDSC	myeloide Suppressorzelle (engl.: <i>myeloid-derived suppressor cell</i> )
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MFI	mittleren Fluoreszenzintensität (engl.: <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMR	Basen-Fehlpaarungsreparatur (engl.: <i>mismatch repair</i> )
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
Ms	Maus
MSC	mesenchymale Stammzelle (engl.: <i>mesenchymal stem cell</i> )
MW	Mittelwert
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (engl.: <i>nucleotide excision repair</i> )
NES	Kernexport-Signal (engl.: <i>nuclear export signal</i> )
NF- $\kappa$ B	engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	nicht-homologe Rekombination (engl.: <i>non-homologous end joining</i> )
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	Kernlokalisierungs-Sequenz (engl.: <i>nuclear localization sequence</i> )
NPC	Nasopharynxkarzinom (engl.: <i>nasopharyngeal carcinoma</i> )
NPC	Kernporen-Komplex (engl.: <i>nuclear pore complex</i> )
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: <i>non-small cell lung carcinoma</i> )
OE	Überexpression (engl.: <i>overexpression</i> )
OSCC	orales Plattenepithelkarzinom (engl.: <i>oral squamous cell carcinoma</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
pcDNA	Plasmid-cDNA
PCI	Pittsburgh Cancer Institute
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-1	Programmed Death -1
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor (engl.: <i>platelet-derived growth factor</i> )
PD-L1	Programmed Death Ligand-1

PPS-Score	engl.: <i>combined positive score</i> (PD-L1 und tumorinfiltrierende Zellen)
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R/M	rezidivierend oder metastasierend
Rb	Kaninchen (engl.: <i>rabbit</i> )
RCC	Nierenzellkarzinom (eng.: <i>renal cell carcinoma</i> )
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer
RIP-seq	RNA-Immunpräzipitations-Sequenzierung
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex (engl.: <i>RNA-induced silencing complex</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
Rt	Ratte
RT-qPCR	quantitative real-time PCR
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i> )
SI	engl.: <i>Staining Index</i>
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
SSB	Einzelstrangbruch (engl.: <i>single strand break</i> )
SSC	Seitwärts gestreutes Licht (engl.: <i>sideways scatter</i> )
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>TRIS-buffered saline</i> )
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit TWEEN <sup>®</sup> 20
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: <i>T-cell receptor</i> )
TGF	transformierende Wachstumsfaktor (engl.: <i>transforming growth factor</i> )
TNF	Tumornekrose-Faktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
UTR	untranslatierte Region
UVB	Ultraviolettstrahlung von 280 bis 315 nm
WB	Western Blot

### 6.1.3 Chemische Verbindungen

APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: <i>bicinchoninic acid</i> )
BIO	(2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim
CaCl <sub>2</sub>	Kaliumchlorid
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Salzsäure
LiCl	Lithiumchlorid
MeOH	Methanol
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PS	Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sulfo-NHS-SS	Sulfosuccinimidyl-2-(Biotinamido)-Ethyl-1,3-dithiopropionat
TEMED	Tetramethylethylendiamin



### 6.1.4 Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
cm	Zentimeter
ct	Zyklus-Schwellenwert (engl.: <i>cycle threshold</i> )
G	Gauge
Gy	Gray
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MV	Megavolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
rcf	relative Zentrifugalkraft (engl.: <i>relative centrifugal force</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
Std	Stunde
TGOA	Die Gesamtheit der grün-fluoreszierenden Objekte innerhalb der beobachteten Fläche (engl.: <i>total green object area</i> )
V	Volt
x	-fach

### 6.1.5 Individuelle Abkürzungen

EA	früh-apoptotisch (engl.: <i>early apoptotic</i> )
Iso	Isotyp-Kontrolle
LA	spät-apoptotisch (engl.: <i>late apoptotic</i> )
N	nekrotisch
RR	radioresistent
RS	radiosensitiv
RT	Raumtemperatur
sf	serumfrei
TR	Transfektionsreagenz
V	vital
VD	Verdünnung

### 6.1.6 Symbole

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\Delta$	delta
$\varepsilon$	epsilon
$\kappa$	kappa

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Mögliche DNA-Schäden und bekannte Reparaturmechanismen.....	12
<b>Abbildung 2</b>	DNA damage response .....	12
<b>Abbildung 3</b>	Entwicklungsstufen des oralen Plattenepithelkarzinoms .....	13
<b>Abbildung 4</b>	Veränderungen der Mundschleimhaut .....	14
<b>Abbildung 5</b>	Zelluläre Zusammensetzung des Tumorgewebes.....	16
<b>Abbildung 6</b>	<i>Hallmarks of Cancer</i> .....	18
<b>Abbildung 7</b>	Hauptbestandteile des Immunsystems .....	20
<b>Abbildung 8</b>	Generierung einer antitumoralen Immunantwort.....	21
<b>Abbildung 9</b>	T-Zell-aktivierende und -inhibierenden Rezeptoren .....	22
<b>Abbildung 10</b>	PD-L1-Gen-, -mRNA- und -Proteinstruktur .....	24
<b>Abbildung 11</b>	Lokale Inhibition der Immunantwort durch PD-L1 (IHC-Färbung am Melanom) .....	25
<b>Abbildung 12</b>	Elektronenmikroskopische Aufnahmen apoptischer Zellen.....	28
<b>Abbildung 13</b>	Apoptose-Kaskade .....	29
<b>Abbildung 14</b>	Zelluläre Reaktion auf ionisierende Strahlung.....	30
<b>Abbildung 15</b>	Interaktion von T-Lymphozyt und Tumorzelle.....	35
<b>Abbildung 16</b>	<i>Hanging drop</i> - Methode.....	47
<b>Abbildung 17</b>	Formung eines Sphäroids .....	47
<b>Abbildung 18</b>	Linearbeschleuniger des UKR .....	49
<b>Abbildung 19</b>	Transiente siRNA-Transfektion .....	51
<b>Abbildung 20</b>	Zeitliche Abfolge einer siRNA Transfektion .....	51
<b>Abbildung 21</b>	Schematische Plasmidkarte von PD-L1 pcDNA 3.1 (+).....	52
<b>Abbildung 22</b>	Transiente Plasmid-Transfektion .....	53
<b>Abbildung 23</b>	Zeitliche Abfolge einer Plasmid-Transfektion .....	53
<b>Abbildung 24</b>	Plattenlayout des Human Cell Motility RT <sup>2</sup> Profiler PCR-Array .....	60
<b>Abbildung 25</b>	Nachweisreaktion des BCA-Assays .....	62
<b>Abbildung 26</b>	Prinzip der WB-Analyse .....	65
<b>Abbildung 27</b>	Ko-Immunpräzipitation.....	68
<b>Abbildung 28</b>	FACS-Apoptoseassay.....	71
<b>Abbildung 29</b>	PD-L1-Annexin V-Doppelfärbung (FACS).....	73
<b>Abbildung 30</b>	Interaktion von Protein und Sulfo-NHS-SS-Biotin.....	75

<b>Abbildung 31</b>	Isolation von Membranproteinen mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin .....	<b>76</b>
<b>Abbildung 32</b>	Aufbau einer eukaryotischen Zelle .....	<b>78</b>
<b>Abbildung 33</b>	Prinzip der DAB-Färbung .....	<b>80</b>
<b>Abbildung 34</b>	Chemische Reaktion des MTT-Assays .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 35</b>	Mikroskopisch Aufnahme von Zellen nach MTT-Inkubation .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 36</b>	Chemische Reaktion des WST-1 Assays .....	<b>84</b>
<b>Abbildung 37</b>	Prinzip der YOYO-1-Färbung.....	<b>85</b>
<b>Abbildung 38</b>	Chemotaxis-Assay nach Boyden.....	<b>86</b>
<b>Abbildung 39</b>	Flächenausbreitung eines Sphäroids .....	<b>88</b>
<b>Abbildung 40</b>	Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten HNSCC-Zelllinien.....	<b>91</b>
<b>Abbildung 41</b>	Mikroskopische Aufnahmen von HNSCC-Zelllinien nach Radiatio .....	<b>92</b>
<b>Abbildung 42</b>	WST-1 Vitalitäts-Assay nach Radiatio .....	<b>93</b>
<b>Abbildung 43</b>	Verdopplungszeit nach Radiatio .....	<b>94</b>
<b>Abbildung 44</b>	Zytotoxizitätsassay nach Radiatio ( <i>Live Cell Imaging</i> ) .....	<b>95</b>
<b>Abbildung 45</b>	Repräsentative Bilder des <i>Live Cell Imaging</i> zur Zellkonfluenz .....	<b>96</b>
<b>Abbildung 46</b>	PD-L1-Genexpression (RT qPCR).....	<b>97</b>
<b>Abbildung 47</b>	PD-L1-Proteinexpression (WB).....	<b>98</b>
<b>Abbildung 48</b>	PD-L1-Membranexpression (FACS) .....	<b>99</b>
<b>Abbildung 49</b>	FACS-Apoptose-Assay nach Radiatio .....	<b>101</b>
<b>Abbildung 50</b>	PD-L1-Proteinexpression nach Radiatio (WB).....	<b>102</b>
<b>Abbildung 51</b>	Strahlungsbedingte Expression von EMT-Markern in 2D-Zellkultur .....	<b>103</b>
<b>Abbildung 52</b>	PD-L1-Membranexpression nach Radiatio (FACS) .....	<b>105</b>
<b>Abbildung 53</b>	Delta Staining Index RS Zelllinien nach Radiatio (FACS).....	<b>106</b>
<b>Abbildung 54</b>	PD-L1-Membranexpression nach Selektionierung (WB) .....	<b>106</b>
<b>Abbildung 55</b>	PD-L1-Kernexpression nach Fraktionierung (WB) .....	<b>107</b>
<b>Abbildung 56</b>	PD-L1-Zytoplasmaexpression Fraktionierung (WB).....	<b>108</b>
<b>Abbildung 57</b>	Annexin V-PD-L1-Doppelfärbung in RS Zelllinien (FACS) .....	<b>109</b>
<b>Abbildung 58</b>	Annexin V-PD-L1-Doppelfärbung in RR Zelllinien (FACS).....	<b>110</b>
<b>Abbildung 59</b>	PD-L1-positive/negative Subpopulationen nach Radiatio (FACS).....	<b>111</b>
<b>Abbildung 60</b>	Haltbarkeit der transienten PD-L1-Überexpression (WB) .....	<b>112</b>
<b>Abbildung 61</b>	Haltbarkeit des transienten PD-L1-Knockdowns (WB).....	<b>113</b>
<b>Abbildung 62</b>	PD-L1 als Selektionsvorteil für RS Zelllinien nach Radiatio (DAB-Färbung) ....	<b>114</b>

<b>Abbildung 63</b>	PD-L1 als Selektionsvorteil für RS Zelllinien nach Radiatio ( <i>Live Cell Imaging</i> )	<b>115</b>
<b>Abbildung 64</b>	Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation der RR Zelllinien (WST-1) .....	<b>116</b>
<b>Abbildung 65</b>	DAB- und HE-Färbung nach PD-L1-OE in der RS Zelllinie PCI 9 .....	<b>117</b>
<b>Abbildung 66</b>	Migrations- und Invasions-Assay (Boyden-Kammer) .....	<b>118</b>
<b>Abbildung 67</b>	Proteinexpression von GSK-3 $\beta$ und Phospho-GSK-3 $\beta$ nach Radiatio .....	<b>119</b>
<b>Abbildung 68</b>	Stabilisierung von PD-L1 nach GSK-3 $\beta$ -Inaktivierung (WB).....	<b>120</b>
<b>Abbildung 69</b>	Nachweis direkter Interaktion GSK-3 $\beta$ /PD-L1 mittels Ko-IP (WB).....	<b>121</b>
<b>Abbildung 70</b>	Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung von inhibitorischen Konzentrationen...	<b>122</b>
<b>Abbildung 71</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Zellkonfluenz nach Buparlisib-Inkubation.....	<b>123</b>
<b>Abbildung 72</b>	Einfluss von Buparlisib auf die Aktivität von Akt (WB).....	<b>124</b>
<b>Abbildung 73</b>	Einfluss von Buparlisib auf die Expression von PD-L1 (WB) .....	<b>125</b>
<b>Abbildung 74</b>	Einfluss von Buparlisib auf die PD-L1-Membranexpression (FACS).....	<b>126</b>
<b>Abbildung 75</b>	Anteil PD-L1-positiver Zellen nach Buparlisib-Inkubation (FACS).....	<b>126</b>
<b>Abbildung 76</b>	Einfluss von Buparlisib und Radiatio auf die PD-L1-Expression (WB).....	<b>127</b>
<b>Abbildung 77</b>	Einfluss von PD-L1-OE und Buparlisib auf Proliferation ( <i>Live Cell Imaging</i> )..	<b>128</b>
<b>Abbildung 78</b>	Nachweis direkter Interaktion PD-L1/Akt in RR Zelllinien mittels Ko-IP (WB)	<b>129</b>
<b>Abbildung 79</b>	PD-L1-abhängige Expression von EMT-Markern in 3D-Zellkultur.....	<b>130</b>
<b>Abbildung 80</b>	Flächenausbreitung von Sphäroiden auf unterschiedlichen Matrizes .....	<b>132</b>
<b>Abbildung 81</b>	Genexpressionsanalyse Zellmotilitäts-assoziiierter Gene .....	<b>133</b>
<b>Abbildung 82</b>	Induktion von Apoptose nach starkem Zell-Zell-Kontakt ( <i>Live Cell Imaging</i> )..	<b>137</b>
<b>Abbildung 83</b>	Differenzierte und undifferenzierte Bereiche desselben Tumors.....	<b>138</b>
<b>Abbildung 84</b>	PD-L1-Expression in Primärtumor und Metastase .....	<b>139</b>
<b>Abbildung 85</b>	Vergleich monoklonaler anti-PD-L1-Antikörper von IHC-Färbungen.....	<b>140</b>
<b>Abbildung 86</b>	Bekannte Regulationsmechanismen/Modifikationen/Expressionen von PD-L1	<b>141</b>
<b>Abbildung 87</b>	GSK-3 $\beta$ im aktiven und inaktiven Zustand.....	<b>148</b>
<b>Abbildung 88</b>	Übersicht über bekannte posttranslationale Modifikationen von PD-L1 .....	<b>151</b>
<b>Abbildung 89</b>	Molekulargewicht von PD-L1 nach PD-L1-Überexpression (WB).....	<b>152</b>
<b>Abbildung 90</b>	PD-L1-Antikörper-Bindestellen der verwendeten Antikörper .....	<b>153</b>
<b>Abbildung 91</b>	Verteilung der Zellpopulation nach Größe (FSC) und Granularität (SSC).....	<b>154</b>
<b>Abbildung 92</b>	Vergleich unterschiedlicher PD-L1-Färbemethoden (IF und DAB).....	<b>158</b>
<b>Abbildung 93</b>	PD-L1-Expression, abhängig von Zellzyklus und Konfluenz (WB) .....	<b>160</b>

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Nähere Beschreibung der verwendeten HNSCC-Zelllinien .....	38
<b>Tabelle 2</b>	Reagenzien und Lösungen .....	39
<b>Tabelle 3</b>	Kits und Arrays .....	41
<b>Tabelle 4</b>	Antikörper .....	41
<b>Tabelle 5</b>	siRNA und Plasmide .....	42
<b>Tabelle 6</b>	Primer und Sonden .....	42
<b>Tabelle 7</b>	Verbrauchsmaterial.....	42
<b>Tabelle 8</b>	Geräte.....	44
<b>Tabelle 9</b>	Software .....	45
<b>Tabelle 10</b>	Ermittlung der RNA-Reinheit .....	55
<b>Tabelle 11</b>	Denaturierungspuffer für die reverse Transkription.....	57
<b>Tabelle 12</b>	Transkriptionspuffer für die reverse Transkription .....	57
<b>Tabelle 13</b>	Programm zur Durchführung der reversen Transkription .....	57
<b>Tabelle 14</b>	Primer der qPCR .....	58
<b>Tabelle 15</b>	Reagenzien der qPCR.....	58
<b>Tabelle 16</b>	Programm zur Durchführung der qPCR.....	58
<b>Tabelle 17</b>	Reaktionsmix des qPCR Arrays.....	59
<b>Tabelle 18</b>	Programm zur Durchführung des RT <sup>2</sup> Profile PCR-Arrays .....	60
<b>Tabelle 19</b>	RIPA-Lysepuffer .....	61
<b>Tabelle 20</b>	10 %-Acrylamid-Trenngel und <b>Tabelle 21</b> 4 %-Acrylamid-Sammelgel .....	63
<b>Tabelle 22</b>	Primär-Antikörper der WB-Analyse .....	66
<b>Tabelle 23</b>	Sekundär-Antikörper der WB-Analyse .....	66
<b>Tabelle 24</b>	5 % Lämmli-Puffer (5x) .....	67
<b>Tabelle 25</b>	10x SDS-PAGE-Puffer, 1 L und <b>Tabelle 26</b> 1x SDS-PAGE-Puffer, 1 L.....	67
<b>Tabelle 27</b>	10x Blotting-Puffer, 1 L und <b>Tabelle 28</b> 1x Blotting-Puffer, 1 L .....	67
<b>Tabelle 29</b>	10x TBS pH 7,5, 1 L und <b>Tabelle 30</b> 1x TBST, 1 L.....	67
<b>Tabelle 31</b>	Capture-Antikörper der MACS-Analyse .....	69
<b>Tabelle 32</b>	Antikörper der FACS-Analyse.....	74
<b>Tabelle 33</b>	Reagenzien der FACS-Analyse.....	74
<b>Tabelle 34</b>	FACS-Puffer, 50 ml.....	74
<b>Tabelle 35</b>	10x Annexin-Binding Puffer pH 7,4, 200 ml.....	74
<b>Tabelle 36</b>	1x Annexin-Binding-Buffer, 50 ml .....	74

<b>Tabelle 37</b> Waschpuffer: PBS pH 8,0.....	77
<b>Tabelle 38</b> Quenching: 25 mM TRIS pH 8,0.....	77
<b>Tabelle 39</b> Lyse-Puffer (Membran Selektionierung).....	77
<b>Tabelle 40</b> 1x Lämmli-Puffer .....	77
<b>Tabelle 41</b> Fixierlösung, 4 % PFA .....	81
<b>Tabelle 42</b> Permeabilisierungs-Puffer DAB 0,1 % Triton.....	81
<b>Tabelle 43</b> Puffer zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase .....	81
<b>Tabelle 44</b> Zellzahl zur Bestimmung der Proliferationsrate (MTT-Assay) .....	82
<b>Tabelle 45</b> 10x Kristallviolett-Lösung und <b>Tabelle 46</b> 1x Kristallviolett-Lösung .....	87
<b>Tabelle 47</b> Glutaraldehyd, 1 % .....	87
<b>Tabelle 48</b> Verwendete Zelllinien, unterteilt nach Radiosensitivität.....	90
<b>Tabelle 49</b> Inhibitorische Konzentrationen von Buparlisib .....	122

## 6.4 Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet Lond Engl.* 17. Mai 2008;371(9625):1695–709.
3. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers.* 20. März 2020;12(3).
4. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtneß B, Gillison ML, Harrington KJ, u. a. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer.* 15 2019;7(1):184.
5. Bousiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med.* 3. November 2016;375(18):1767–78.
6. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, u. a. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol.* 3. März 2014;32(10):1020–30.
7. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, u. a. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. Juni 2015;33(18):2004–12.
8. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, u. a. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2. Juli 2015;373(1):23–34.
9. Seiwert TL, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, u. a. 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.* 1. Juli 2016;17(7):956–65.
10. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, u. a. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 10 2016;375(19):1856–67.
11. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, u. a. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 14. Mai 2019;116(20):9999–10008.
12. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019;
13. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology.* 2016;91(1):13–23.



14. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update: Oral & Oropharyngeal Cancer Update. *CA Cancer J Clin.* September 2015;65(5):401–21.
15. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, u. a. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 16. Mai 2007;99(10):777–89.
16. Huang C-C, Hsiao J-R, Lee W-T, Lee Y-C, Ou C-Y, Chang C-C, u. a. Investigating the Association between Alcohol and Risk of Head and Neck Cancer in Taiwan. *Sci Rep.* 29. August 2017;7(1):9701.
17. Lee Y-CA, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlabeln H, u. a. Active and Involuntary Tobacco Smoking and Upper Aerodigestive Tract Cancer Risks in a Multicenter Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Prev Biomark.* 1. Dezember 2009;18(12):3353–61.
18. Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PVR, Liyanage RLPR, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 1. April 2012;113(4):518–25.
19. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol.* Juni 2014;44(6):1799–805.
20. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, u. a. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* November 2014;15(12):1319–31.
21. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* Mai 2002;2(5):342–50.
22. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A, u. a. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer.* 20. März 2002;98(3):440–5.
23. Collett D, Mumford L, Banner NR, Neuberger J, Watson C. Comparison of the Incidence of Malignancy in Recipients of Different Types of Organ: A UK Registry Audit. *Am J Transplant.* 2010;10(8):1889–96.
24. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet.* 7. Juli 2007;370(9581):59–67.
25. van Leeuwen MT, Grulich AE, McDonald SP, McCredie MRE, Amin J, Stewart JH, u. a. Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* Februar 2009;18(2):561–9.
26. Masserot C, Latour RP de, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, u. a. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer.* 2008;113(12):3315–22.

27. Su C-C, Tsai K-Y, Hsu Y-Y, Lin Y-Y, Lian I-B. Chronic exposure to heavy metals and risk of oral cancer in Taiwanese males. *Oral Oncol.* August 2010;46(8):586–90.
28. Riechelmann H. Berufliche Verursachung und Bewertung von Mundhöhlen- und Rachentumoren. *Laryngo-Rhino-Otol.* September 2002;81(08):573–9.
29. Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck.* September 2009;31(9):1228–39.
30. Wang L, Ganly I. The oral microbiome and oral cancer. *Clin Lab Med.* Dezember 2014;34(4):711–9.
31. Hayes RB, Ahn J, Fan X, Peters BA, Ma Y, Yang L, u. a. Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol.* 1. März 2018;4(3):358–65.
32. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, u. a. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* Dezember 2013;40(6):463–71.
33. Bernstein C, Prasad AR, Nfonsam V, Bernstein H. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. *New Res Dir DNA Repair [Internet].* 22. Mai 2013 [zitiert 22. August 2020]; Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/dna-damage-dna-repair-and-cancer>
34. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* Juni 2017;58(5):235–63.
35. Bach C, Patra P. Human genome regulation. *Bioengineered.* 2. April 2016;7(2):57–9.
36. Bębenek A, Ziuzia-Graczyk I. Fidelity of DNA replication-a matter of proofreading. *Curr Genet.* Oktober 2018;64(5):985–96.
37. Fishel R. Mismatch Repair. *J Biol Chem.* 30. Oktober 2015;290(44):26395–403.
38. Perrone S, Lotti F, Geronzi U, Guidoni E, Longini M, Buonocore G. Oxidative Stress in Cancer-Prone Genetic Diseases in Pediatric Age: The Role of Mitochondrial Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4782426.
39. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature.* 17. August 1957;180(4581):326–8.
40. Lonergan GJ, Cline DB, Abbondanzo SL. Sickle cell anemia. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* August 2001;21(4):971–94.
41. Brenner S. Nonsense Mutants and the Genetic Code: A Small Piece of Molecular Genetics. *JAMA.* 15. November 1971;218(7):1023–6.
42. Roth JR. Frameshift mutations. *Annu Rev Genet.* 1974;8:319–46.
43. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988;35:95–125.
44. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Juli 2014;15(7):465–81.

45. Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*. 15. Juni 2011;14(12):2491–507.
46. Crutzen PJ, Andreae MO. Biomass Burning in the Tropics: Impact on Atmospheric Chemistry and Biogeochemical Cycles. *Science*. 21. Dezember 1990;250(4988):1669–78.
47. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. April 2013;5(4):a012583.
48. Lawley PD. Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1966;5:89–131.
49. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(8):495–506.
50. Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol* [Internet]. 21. Dezember 2015 [zitiert 22. August 2020];5. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4685147/>
51. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 25 2016;11(1):159.
52. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 23. November 2000;408(6811):433–9.
53. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. Juli 2014;8(1):7–11.
54. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 11. September 2008;359(11):1143–54.
55. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. Januar 2011;11(1):9–22.
56. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, u. a. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 15. August 1996;56(16):3630–3.
57. Smeets SJ, Plas M van der, Schaaij-Visser TBM, Veen EAM van, Meerloo J van, Braakhuis BJM, u. a. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer*. 2011;128(7):1596–605.
58. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, u. a. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1. Juni 1996;56(11):2488–92.
59. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, u. a. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1. Juni 2007;25(16):2164–70.

60. Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, u. a. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer*. 15. Juni 1989;63(12):2522–7.
61. Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: A review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1. August 1996;54(8):949–54.
62. Scully C, Bagan JV, Hopper C, Epstein JB. Oral cancer: current and future diagnostic techniques. *Am J Dent*. August 2008;21(4):199–209.
63. Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, u. a. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 01 2017;123(9):1566–75.
64. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. Juni 2010;46(6):414–7.
65. Viet CT, Schmidt BL. Biologic Mechanisms of Oral Cancer Pain and Implications for Clinical Therapy. *J Dent Res*. Mai 2012;91(5):447–53.
66. Messadi DV. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *Int J Oral Sci*. Juni 2013;5(2):59–65.
67. Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms: Version 2.0“. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Herausgeber. 2012 [zitiert 22. August 2020]; Verfügbar unter: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/007-100OLI\\_S3\\_Mundh%C3%B6hlenkarzinom\\_122012-122015-abgelaufen.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-100OLI_S3_Mundh%C3%B6hlenkarzinom_122012-122015-abgelaufen.pdf)
68. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol*. Januar 2015;12(1):11–26.
69. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2001;1(1):46–54.
70. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. November 2004;4(11):839–49.
71. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. Juli 1997;3(7):730–7.
72. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore)*. September 2016;95(1 Suppl 1):S20-25.
73. Chen D, Wang C-Y. Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precis Clin Med*. September 2019;2(3):152–65.
74. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4. März 2011;144(5):646–74.
75. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 6. Oktober 2008;27(45):5904–12.

76. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans.* 08 2017;45(1):229–36.
77. Yang L, Lin PC. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. *Semin Cancer Biol.* 2017;47:185–95.
78. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, u. a. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 16. Januar 2003;348(3):203–13.
79. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, u. a. The Ratios of CD8+ T Cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLoS ONE* [Internet]. 14. November 2013 [zitiert 22. August 2020];8(11). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828213/>
80. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. April 2015;194(7):2985–91.
81. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2. April 2010;141(1):39–51.
82. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 7. Januar 2000;100(1):57–70.
83. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget.* 24. Januar 2017;8(4):7175–80.
84. Bot A. Immunoglobulin deficient mice generated by gene targeting as models for studying the immune response. *Int Rev Immunol.* 1996;13(4):327–40.
85. Appelbaum JW. The role of the immune system in the pathogenesis of cancer. *Semin Oncol Nurs.* Februar 1992;8(1):51–62.
86. Seelige R, Searles S, Bui JD. Mechanisms regulating immune surveillance of cellular stress in cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2018;75(2):225–40.
87. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie* [Internet]. 9. Aufl. Springer Spektrum; 2018 [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.springer.com/de/book/9783662560037>
88. Alles über die Zellen des Immun- & Komplementsystems [Internet]. *Lecturio Magazin.* 2015 [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.lecturio.de/magazin/zellen-des-immun-komplementsystems/>
89. Philippe Funrock. How activation mechanisms influence antibody production by B cells? [Internet]. *ProteoGenix.* 2020 [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.proteogenix.science/scientific-corner/antibody-production/how-activation-mechanisms-influence-antibody-production-by-b-cells-in-the-human-organism/>
90. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 25. Juli 2013;39(1):1–10.

91. Wang L, Wang F-S, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* Oktober 2015;278(4):369–95.
92. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 21. Dezember 2011;480(7378):480–9.
93. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, u. a. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* Oktober 2003;33(10):2706–16.
94. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515–48.
95. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* November 1992;11(11):3887–95.
96. Gibbons RM, Liu X, Pulko V, Harrington SM, Krco CJ, Kwon ED, u. a. B7-H1 limits the entry of effector CD8(+) T cells to the memory pool by upregulating Bim. *Oncoimmunology.* 1. Oktober 2012;1(7):1061–73.
97. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, u. a. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2. Oktober 2000;192(7):1027–34.
98. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, u. a. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* März 2001;2(3):261–8.
99. Tang H, Liang Y, Anders RA, Taube JM, Qiu X, Mulgaonkar A, u. a. PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest.* 01 2018;128(2):580–8.
100. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677–704.
101. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, u. a. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1. August 2003;307(3):672–7.
102. Theodoraki M-N, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 2018;24(4):896–905.
103. [The level of soluble programmed death-1 in peripheral blood of patients with lung cancer and its clinical implications]. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://europepmc.org/article/med/22455965>
104. UniProt Datenbank. Q9NZQ7 (PD1L1\_HUMAN) [Internet]. [zitiert 20. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZQ7>
105. Hsu J-M, Li C-W, Lai Y-J, Hung M-C. Posttranslational Modifications of PD-L1 and Their Applications in Cancer Therapy. *Cancer Res.* 15 2018;78(22):6349–53.

106. He X, Xu L, Liu Y. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking IgV-like domain1. *Acta Pharmacol Sin.* April 2005;26(4):462–8.
107. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* März 2016;27(3):409–16.
108. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, u. a. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 26. April 2001;410(6832):1107–11.
109. Vora AR, Rodgers S, Parker AJ, Start R, Rees RC, Murray AK. An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1997;76(7):836–44.
110. Kuang D-M, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J-P, Wu C, u. a. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med.* 8. Juni 2009;206(6):1327–37.
111. Roth JA. Tumor induced immunosuppression. *Surg Gynecol Obstet.* Februar 1983;156(2): 233–40.
112. Gordan Freeman-PD-1 cancer immunotherapy [Internet]. 2016 [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.youtube.com/watch?v=jBGWH34yUA8>
113. Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol.* 28. Juli 2011;3:33.
114. Güneri P, Epstein JB. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. *Oral Oncol.* Dezember 2014;50(12):1131–6.
115. Kowalski LP, Carvalho AL. Natural history of untreated head and neck cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Mai 2000;36(8):1032–7.
116. Ernani V, Saba NF. Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management. *Oncology.* 2015;89(4):187–95.
117. Dok R, Bamps M, Glorieux M, Zhao P, Sablina A, Nuyts S. Radiosensitization approaches for HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous carcinomas. *Int J Cancer.* 15 2020;146(4):1075–85.
118. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* Juni 2014;50(6):565–74.
119. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* April 2008;83(4):489–501.
120. Xie X, O'Neill W, Pan Q. Immunotherapy for head and neck cancer: the future of treatment? *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(6):701–8.
121. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, u. a. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 6. Mai 2004;350(19):1937–44.

122. Rodgers LW, Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR. Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck*. 1993;15(1):16–9.
123. Hao S-P, Tsang N-M, Chang K-P, Chen C-K, Huang S-S. Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Retromolar Trigone. *The Laryngoscope*. 2006;116(6):916–20.
124. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4. Aufl. Saunders; 2015. 928 S.
125. Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Ohshima M, Asano K, u. a. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. April 1989;59(4):559–62.
126. Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1. September 2003;57(1):246–54.
127. Concu R, Cordeiro MNDS. Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(3):192–8.
128. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, u. a. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. Januar 2010;11(1):21–8.
129. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. August 1972;26(4):239–57.
130. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 12. Oktober 2000;407(6805):770–6.
131. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 9. März 2001;276(10):7320–6.
132. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1. November 1995;182(5):1597–601.
133. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. Juli 2000;301(1):5–17.
134. Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol*. 2000;322:15–8.
135. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. November 2003;171(9):4672–9.
136. Graham H. Webinar Wednesday: For Tracking Anti-Apoptosis Proteins, Scientists Turn to Multiplexing [Internet]. Luminex Corporation. 2018 [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.luminexcorp.com/blog/webinar-wednesday-for-tracking-anti-apoptosis-proteins-scientists-turn-to-multiplexing/>
137. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. Juni 2015;15(6):388–400.



138. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilki; 2011. 546 S.
139. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* August 2010;31(4):363–72.
140. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci.* 14. Januar 2016;17(1).
141. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 27. Dezember 2002;181–182:475–81.
142. Toulany M, Rodemann HP. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Semin Cancer Biol.* Dezember 2015;35:180–90.
143. Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, Sak A, Wang S, Chen J, u. a. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther.* Juli 2008;7(7):1772–81.
144. Ettl T, Viale-Bouroncle S, Hautmann MG, Gosau M, Kölbl O, Reichert TE, u. a. AKT and MET signalling mediates antiapoptotic radioresistance in head neck cancer cell lines. *Oral Oncol.* Februar 2015;51(2):158–63.
145. Rosenthal DI, Harari PM, Giralt J, Bell D, Raben D, Liu J, u. a. Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. April 2016;34(12):1300–8.
146. Peters S, Adjei AA. MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol.* 8. Mai 2012;9(6):314–26.
147. Hartmann S, Bholra NE, Grandis JR. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. August 2016;22(16):4005–13.
148. Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Rockwell S, Andres J, Zlatapolskiy A, u. a. Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 16. Juli 1998;17(2):131–41.
149. Bhardwaj V, Cascone T, Cortez MA, Amini A, Evans J, Komaki RU, u. a. Modulation of c-Met signaling and cellular sensitivity to radiation: potential implications for therapy. *Cancer.* 15. Mai 2013;119(10):1768–75.
150. Sun S, Liu S, Duan SZ, Zhang L, Zhou H, Hu Y, u. a. Targeting the c-Met/FZD8 signaling axis eliminates patient-derived cancer stem-like cells in head and neck squamous carcinomas. *Cancer Res.* 15. Dezember 2014;74(24):7546–59.
151. Lim YC, Kang HJ, Moon JH. C-Met pathway promotes self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cell. *Oral Oncol.* Juli 2014;50(7):633–9.

152. Sun S, Wang Z. Head neck squamous cell carcinoma c-Met<sup>+</sup> cells display cancer stem cell properties and are responsible for cisplatin-resistance and metastasis. *Int J Cancer*. 15. November 2011;129(10):2337–48.
153. Krause M, Yaromina A, Eicheler W, Koch U, Baumann M. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. Dezember 2011;17(23):7224–9.
154. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, u. a. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7. Dezember 2006;444(7120):756–60.
155. Desai A, Webb B, Gerson SL. CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. März 2014;110(3):538–45.
156. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, u. a. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. September 2010;32(9):1195–201.
157. Pullos AN, Castilho RM, Squarize CH. HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. *J Dent Res*. November 2015;94(11):1532–43.
158. Colevas AD, Yom SS, Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, u. a. NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2018;16(5):479–90.
159. Withers HR. Four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol [Internet]*. 1975 [zitiert 22. August 2020];5 S. 241–247. Verfügbar unter: [http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig\\_q=RN:7228292](http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:7228292)
160. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol*. Dezember 1989;56(6):1045–8.
161. European Society for Medical Oncology (ESMO). ESMO Patientenleitlinie „Immuntherapie bedingte Nebenwirkungen und ihr Management“. 2017 [zitiert 22. August 2020]; Verfügbar unter: <https://www.esmo.org/content/download/133758/2490221/file/DE-ESMO-Patientenleitlinie-Immuntherapie-bedingte-Nebenwirkungen-und-ihr-Management.pdf>
162. Haanen JB a. G, Carbonnel F, Robert C, Kerr KM, Peters S, Larkin J, u. a. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1. Juli 2017;28(suppl\_4):iv119–42.
163. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, u. a. 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 Lond Engl*. 23 2019;394(10212):1915–28.
164. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, u. a. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 05 2017;377(14):1345–56.

165. Schneider K, Marbaix E, Bouzin C, Hamoir M, Mahy P, Bol V, u. a. Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol Stockh Swed*. September 2018;57(9):1165–72.
166. Gabrielson A, Wu Y, Wang H, Jiang J, Kallakury B, Gatalica Z, u. a. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC. *Cancer Immunol Res*. Mai 2016;4(5):419–30.
167. Yang Z-Z, Kim HJ, Villasboas JC, Price-Troska T, Jalali S, Wu H, u. a. Mass Cytometry Analysis Reveals that Specific Intratumoral CD4+ T Cell Subsets Correlate with Patient Survival in Follicular Lymphoma. *Cell Rep*. 19 2019;26(8):2178-2193.e3.
168. Perez-Gracia JL, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Sanmamed MF, Melero I. Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol*. April 2014;27:89–97.
169. Abdel-Wahab N, Alshawa A, Suarez-Almazor ME. Adverse Events in Cancer Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol*. 2017;995:155–74.
170. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, u. a. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8. Juli 2003;100(14):8372–7.
171. Kyi C, Postow MA. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Lett*. 21. Januar 2014;588(2):368–76.
172. Karabajakian A, Reverdy T, Gau M, Fayette J. Nivolumab in recurrent/metastatic head and neck cancers. *Future Oncol Lond Engl*. März 2018;14(7):603–9.
173. ONLINE Z. Auszeichnung: Nobelpreis für Medizin geht an James Allison und Tasuku Honjo. *Die Zeit* [Internet]. 1. Oktober 2018 [zitiert 22. August 2020]; Verfügbar unter: <https://www.zeit.de/wissen/2018-10/nobelpreis-fuer-medizin-geht-an-james-p-allison-und-tasuku-honjo>
174. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, u. a. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 28. Juni 2012;366(26):2443–54.
175. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, u. a. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1. Dezember 2013;31(34):4311–8.
176. Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, Chaft JE, Sanborn RE, Gupta A, u. a. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol*. März 2016;17(3):299–308.
177. Haikerwal SJ, Hagekyriakou J, MacManus M, Martin OA, Haynes NM. Building immunity to cancer with radiation therapy. *Cancer Lett*. 28. November 2015;368(2):198–208.
178. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):313–22.

179. Buchwald ZS, Wynne J, Nasti TH, Zhu S, Mourad WF, Yan W, u. a. Radiation, Immune Checkpoint Blockade and the Abscopal Effect: A Critical Review on Timing, Dose and Fractionation. *Front Oncol.* 2018;8:612.
180. Skinner HD, Giri U, Yang LP, Kumar M, Liu Y, Story MD, u. a. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. Juni 2017;23(11):2713–22.
181. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, u. a. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res.* 1. Oktober 2014;74(19):5458–68.
182. Derer A, Deloch L, Rubner Y, Fietkau R, Frey B, Gaipl US. Radio-Immunotherapy-Induced Immunogenic Cancer Cells as Basis for Induction of Systemic Anti-Tumor Immune Responses - Pre-Clinical Evidence and Ongoing Clinical Applications. *Front Immunol.* 2015;6:505.
183. Park SS, Dong H, Liu X, Harrington SM, Krco CJ, Grams MP, u. a. PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol Res.* Juni 2015;3(6):610–9.
184. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer.* 23 2018;6(1):8.
185. Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, Drake CG. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol.* Oktober 2015;16(13):e498-509.
186. Catakovic K, Klieser E, Neureiter D, Geisberger R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal CCS.* 5. Januar 2017;15(1):1.
187. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* April 2013;25(2):214–21.
188. Mishra AK, Kadoishi T, Wang X, Driver E, Chen Z, Wang X-J, u. a. Squamous cell carcinomas escape immune surveillance via inducing chronic activation and exhaustion of CD8+ T Cells co-expressing PD-1 and LAG-3 inhibitory receptors. *Oncotarget.* 6. Dezember 2016;7(49):81341–56.
189. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol.* September 2018;62:29–39.
190. Hellmann MD, Friedman CF, Wolchok JD. Combinatorial Cancer Immunotherapies. *Adv Immunol.* 2016;130:251–77.
191. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, Ligon KL, Rodig SJ, Ramkissoon SH, u. a. Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunol Res.* Februar 2016;4(2):124–35.
192. Suzuki S, Ogawa T, Sano R, Takahara T, Inukai D, Akira S, u. a. Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. *Cancer Sci.* Juni 2020;111(6):1943–57.

193. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, u. a. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature*. 16. April 2015;520(7547):373–7.
194. Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, u. a. Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*. 15. September 1989;49(18):5167–75.
195. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, u. a. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*. Februar 2007;29(2):163–88.
196. Potter SW, Morris JE. Development of mouse embryos in hanging drop culture. *Anat Rec*. Januar 1985;211(1):48–56.
197. Lin R-Z, Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. Oktober 2008;3(9–10):1172–84.
198. Pohl F, Hassel S, Nohe A, Flentje M, Knaus P, Sebald W, u. a. Radiation-induced suppression of the Bmp2 signal transduction pathway in the pluripotent mesenchymal cell line C2C12: an in vitro model for prevention of heterotopic ossification by radiotherapy. *Radiat Res*. März 2003;159(3):345–50.
199. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther*. 2018;28(3):146–57.
200. Cullis PR, Hope MJ. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 05 2017;25(7):1467–75.
201. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*. 26. Januar 2001;280(3):720–5.
202. NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf [Internet]. [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
203. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. Dezember 2001;25(4):402–8.
204. Qiagen. Human Cell Motility RT2 Profile PCR-Arrays [Internet]. Verfügbar unter: <https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/rt2-profiler-pcr-arrays>
205. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. Dezember 2004;62(2):169–73.
206. Sabarth N, Lamer S, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Meyer TF, Bumann D. Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 2. August 2002;277(31):27896–902.
207. Scheurer SB, Roesli C, Neri D, Elia G. A comparison of different biotinylation reagents, tryptic digestion procedures, and mass spectrometric techniques for 2-D peptide mapping of membrane proteins. *Proteomics*. August 2005;5(12):3035–9.

208. Die Zellen - Die kleinsten lebenden Einheiten im Organismus [Internet]. paradisi.de. [zitiert 22. August 2020]. Verfügbar unter: [http://www.paradisi.de/Health\\_und\\_Ernaehrung/Anatomie/Zellen/Artikel/9411.php](http://www.paradisi.de/Health_und_Ernaehrung/Anatomie/Zellen/Artikel/9411.php)
209. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1. März 1962;115:453–66.
210. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics.* Mai 2010;10(9):1886–90.
211. Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):273–85.
212. Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29. April 2003;100(9):5057–62.
213. Pickhard AC, Margraf J, Knopf A, Stark T, Piontek G, Beck C, u. a. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer.* 6. September 2011;11(1):388.
214. Oweida A, Lennon S, Calame D, Korpela S, Bhatia S, Sharma J, u. a. Ionizing radiation sensitizes tumors to PD-L1 immune checkpoint blockade in orthotopic murine head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2017;6(10):e1356153.
215. Haegglblom L, Nordfors C, Tertipis N, Bersani C, Ramqvist T, Näsman A, u. a. Effects of irradiation on human leukocyte antigen class I expression in human papillomavirus positive and negative base of tongue and mobile tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 16. März 2017;
216. MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EHM, Lambur H, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol.* Mai 2003;79(5):351–8.
217. Ganten D, Ruckpaul K, Herausgeber. *Grundlagen der Molekularen Medizin* [Internet]. 3. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008 [zitiert 24. August 2020]. Verfügbar unter: <https://www.springer.com/de/book/9783540694144>
218. Penfornis P, Pochampally R. Colony Forming Unit Assays. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1416:159–69.
219. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.* 17. März 2017;76:9.23.1-9.23.17.
220. Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett.* 18. Januar 2009;273(2):194–200.
221. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng S-C, Genega EM, Fay AP, u. a. Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic sites in clear cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* Oktober 2015;3(10):1158–64.

222. Zajac M, Scott M, Ratcliffe M, Scorer P, Barker C, Al-Masri H, u. a. Concordance among four commercially available, validated programmed cell death ligand-1 assays in urothelial carcinoma. *Diagn Pathol.* 2. September 2019;14(1):99.
223. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, u. a. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2017;12(2):208–22.
224. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, Sabalos C, Schechter N, Li X, u. a. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol.* 8. Oktober 2016;11(1):95.
225. Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, u. a. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol.* 9. Februar 2018;13(1):12.
226. Torlakovic E, Lim HJ, Adam J, Barnes P, Bigras G, Chan AWH, u. a. “Interchangeability” of PD-L1 immunohistochemistry assays: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *Mod Pathol.* Januar 2020;33(1):4–17.
227. Stovgaard ES, Dyhl-Polk A, Roslind A, Balslev E, Nielsen D. PD-L1-Expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* April 2019;174(3):571–84.
228. Mahoney KM, Sun H, Liao X, Hua P, Callea M, Greenfield EA, u. a. PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells. *Cancer Immunol Res.* Dezember 2015;3(12):1308–15.
229. Minichsdorfer C, Oberndorfer F, Krall C, Kornek G, Müllauer L, Wagner C, u. a. PD-L1-Expression on Tumor Cells Is Associated With a Poor Outcome in a Cohort of Caucasian Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Front Oncol.* 2019;9:1334.
230. Cha J-H, Chan L-C, Li C-W, Hsu JL, Hung M-C. Mechanisms Controlling PD-L1-Expression in Cancer. *Mol Cell.* 07 2019;76(3):359–70.
231. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *J Clin Pathol.* März 2018;71(3):189–94.
232. Doi T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Mizushima K, Yasuda T, u. a. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1-Expression in pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep.* März 2017;37(3):1545–54.
233. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJL, Robert L, Foulad D, u. a. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1-Expression in melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. Juli 2014;20(13):3446–57.
234. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, u. a. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov.* Dezember 2013;3(12):1355–63.

235. Chan L-C, Li C-W, Xia W, Hsu J-M, Lee H-H, Cha J-H, u. a. IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *J Clin Invest.* 15 2019;129(8):3324–38.
236. Lim S-O, Li C-W, Xia W, Cha J-H, Chan L-C, Wu Y, u. a. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell.* 12. Dezember 2016;30(6):925–39.
237. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, u. a. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* Januar 2007;13(1):84–8.
238. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell.* 30. März 2012;149(1):22–35.
239. Zhang Y, Yang P, Wang X-F. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. *Trends Cell Biol.* März 2014;24(3):153–60.
240. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA, u. a. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1-Expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 28. Oktober 2014;5:5241.
241. Chang C-J, Chao C-H, Xia W, Yang J-Y, Xiong Y, Li C-W, u. a. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol.* März 2011;13(3):317–23.
242. Xu S, Tao Z, Hai B, Liang H, Shi Y, Wang T, u. a. miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint. *Nat Commun.* 05 2016;7:11406.
243. Xie G, Li W, Li R, Wu K, Zhao E, Zhang Y, u. a. Helicobacter Pylori Promote B7-H1 Expression by Suppressing miR-152 and miR-200b in Gastric Cancer Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 5. Januar 2017 [zitiert 24. August 2020];12(1). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5215825/>
244. Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y, u. a. The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Int J Mol Sci* [Internet]. 27. November 2017 [zitiert 24. August 2020];18(12). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751143/>
245. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, u. a. Aberrant PD-L1-Expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* Juni 2016;534(7607):402–6.
246. Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, u. a. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in Ovarian Cancer and Melanoma. *Cancer Res.* 01 2016;76(23):6964–74.
247. Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibañez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, u. a. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* 22. August 2017;20(8):1818–29.
248. Almozan S, Colak D, Mansour F, Alaiya A, Al-Harazi O, Qattan A, u. a. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J Cancer.* 01 2017;141(7):1402–12.



249. Liu S, Chen S, Yuan W, Wang H, Chen K, Li D, u. a. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget*. 21. November 2017;8(59):99901–12.
250. Chen L, Xiong Y, Li J, Zheng X, Zhou Q, Turner A, u. a. PD-L1-Expression Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2017;42(6):2267–80.
251. Ock C-Y, Kim S, Keam B, Kim M, Kim TM, Kim J-H, u. a. PD-L1-Expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 17. Februar 2016;7(13):15901–14.
252. Müller T, Braun M, Dietrich D, Aktekin S, Höft S, Kristiansen G, u. a. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 8. August 2017;8(32):52889–900.
253. Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in Cancer Initiation, Development and Treatment: Beyond Immune Evasion. *Front Oncol [Internet]*. 19. September 2018 [zitiert 21. August 2020];8. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156376/>
254. Ruffner RS, Ramsey A, O'Malley BW, Li D. Abstract 5474: PD-L1 regulates cisplatin chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1. August 2015;75(15 Supplement):5474–5474.
255. Mouw KW, Konstantinopoulos PA. From checkpoint to checkpoint: DNA damage ATR/Chk1 checkpoint signalling elicits PD-L1 immune checkpoint activation. *Br J Cancer*. 2018;118(7):933–5.
256. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, u. a. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1-Expression in cancer cells. *Nat Commun*. 24 2017;8(1):1751.
257. Tu X, Qin B, Zhang Y, Zhang C, Kahila M, Nowsheen S, u. a. PD-L1 (B7-H1) Competes with the RNA Exosome to Regulate the DNA Damage Response and Can Be Targeted to Sensitize to Radiation or Chemotherapy. *Mol Cell*. 20 2019;74(6):1215-1226.e4.
258. Savage KI, Gorski JJ, Barros EM, Irwin GW, Manti L, Powell AJ, u. a. Identification of a BRCA1-mRNA splicing complex required for efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. *Mol Cell*. 8. Mai 2014;54(3):445–59.
259. Shivji MKK, Renaudin X, Williams ÇH, Venkitaraman AR. BRCA2 Regulates Transcription Elongation by RNA Polymerase II to Prevent R-Loop Accumulation. *Cell Rep*. 23 2018;22(4):1031–9.
260. Bhatia V, Barroso SI, García-Rubio ML, Tumini E, Herrera-Moyano E, Aguilera A. BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature*. 17. Juli 2014;511(7509):362–5.
261. Zinder JC, Lima CD. Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev*. 15. Januar 2017;31(2):88–100.
262. Ogami K, Chen Y, Manley JL. RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: mechanisms and significance. *Non-Coding RNA*. 2018;4(1).

263. Meng X, Yang S, Camp VJA. The Interplay Between the DNA Damage Response, RNA Processing and Extracellular Vesicles. *Front Oncol* [Internet]. 17. Januar 2020 [zitiert 21. August 2020];9. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6978769/>
264. Visan I. CMTM6 controls PD-L1. *Nat Immunol*. 19. September 2017;18(10):1067.
265. Ju X, Zhang H, Zhou Z, Wang Q. Regulation of PD-L1-Expression in cancer and clinical implications in immunotherapy. *Am J Cancer Res*. 1. Januar 2020;10(1):1–11.
266. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MGM, Xu ML, u. a. PD-L1-Expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. Juli 2013;19(13):3462–73.
267. Grosso J, Inzunza D, Wu Q, Simon J, Singh P, Zhang X, u. a. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. *J Immunother Cancer*. 7. November 2013;1(Suppl 1):P53.
268. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. Juni 2008;8(6):467–77.
269. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131403.
270. Qing Y, Li Q, Ren T, Xia W, Peng Y, Liu G-L, u. a. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:901–9.
271. Qin T, Zeng Y, Qin G, Xu F, Lu J, Fang W, u. a. High PD-L1-Expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget*. 20. Oktober 2015;6(32):33972–81.
272. Shin S-J, Jeon YK, Cho YM, Lee J-L, Chung DH, Park JY, u. a. The Association Between PD-L1-Expression and the Clinical Outcomes to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy in Patients With Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist*. November 2015;20(11):1253–60.
273. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, u. a. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1-Expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 28. April 2015;112(9):1501–9.
274. Gevensleben H, Dietrich D, Golletz C, Steiner S, Jung M, Thiesler T, u. a. The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. April 2016;22(8):1969–77.
275. Lin Y-M, Sung W-W, Hsieh M-J, Tsai S-C, Lai H-W, Yang S-M, u. a. High PD-L1-Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142656.
276. Okan Cakir M, Kirca O, Gunduz S, Ozdogan M. Hyperprogression after immunotherapy: A comprehensive review. *J BUON Off J Balk Union Oncol*. Dezember 2019;24(6):2232–41.
277. Li C-W, Lim S-O, Xia W, Lee H-H, Chan L-C, Kuo C-W, u. a. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun*. 30 2016;7:12632.

278. Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol.* 2017;11(7):718–38.
279. Ock C-Y, Kim S, Keam B, Kim S, Ahn Y-O, Chung E-J, u. a. Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 16. Juni 2017;8(58):97920–7.
280. Pelekanou V, Barlow WE, Nahleh ZA, Wasserman B, Lo Y-C, von Wahlde M-K, u. a. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1-Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(6):1324–31.
281. Sheng J, Fang W, Yu J, Chen N, Zhan J, Ma Y, u. a. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep [Internet].* 29. Januar 2016 [zitiert 24. August 2020];6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731819/>
282. Chang C-H, Qiu J, O’Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, u. a. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 10. September 2015;162(6):1229–41.
283. Parikh F, Duluc D, Imai N, Clark A, Misiukiewicz K, Bonomi M, u. a. Chemoradiotherapy-Induced Upregulation of PD-1 Antagonizes Immunity to HPV-Related Oropharyngeal Cancer. *Cancer Res.* 15. Dezember 2014;74(24):7205–16.
284. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, u. a. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 21. Mai 2015;372(21):2018–28.
285. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, u. a. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 11. Juli 2013;369(2):134–44.
286. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, u. a. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* Januar 2014;15(1):69–77.
287. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, u. a. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 9. Juli 2015;373(2):123–35.
288. American Association for Cancer Research, Herausgeber. Nivolumab Doubles Survival for Patients with HNSCC. *Cancer Discov.* 2016;6(7):OF3.
289. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, u. a. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest.* Februar 2014;124(2):687–95.
290. Voong KR, Naidoo J, Ettinger DS. The next frontier in non–small cell lung cancer: Synergizing radiation therapy and immune checkpoint blockade. *Clin Adv Hematol Oncol.* August 2017;15(8):615–25.

291. Qin Q, Nan X, Miller T, Fisher R, Teh B, Pandita S, u. a. Complete Local and Abscopal Responses from a Combination of Radiation and Nivolumab in Refractory Hodgkin's Lymphoma. *Radiat Res.* 2018;190(3):322–9.
292. Ma C, Wang J, Gao Y, Gao T-W, Chen G, Bower KA, u. a. The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res.* 15. August 2007;67(16):7756–64.
293. Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM. Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog.* Dezember 2002;35(4):180–5.
294. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer.* 11. Juni 2010;9:144.
295. PubChem. Cycloheximide [Internet]. [zitiert 24. August 2020]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6197>
296. Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. Occurrence and biological roles of „proximal glycanases“ in animal cells. *Glycobiology.* Dezember 1994;4(6):777–89.
297. Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, Lei Y, Chandran U, Seethala RR, u. a. Identification of the Cell-Intrinsic and -Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFN $\gamma$  That Induce PD-L1-Expression in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 1. März 2016;76(5):1031–43.
298. Chen L, Yang Q-C, Li Y-C, Yang L-L, Liu J-F, Li H, u. a. Targeting CMTM6 Suppresses Stem Cell-Like Properties and Enhances Antitumor Immunity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(2):179–91.
299. Xie F, Xu M, Lu J, Mao L, Wang S. The role of exosomal PD-L1 in tumor progression and immunotherapy. *Mol Cancer.* 23 2019;18(1):146.
300. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, u. a. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2018;560(7718):382–6.
301. Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E, Al-Romaih K, Tulbah A, Al-Alwan M, u. a. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12(4):R48.
302. Satelli A, Batth IS, Brownlee Z, Rojas C, Meng QH, Kopetz S, u. a. Potential role of nuclear PD-L1-Expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep.* 01 2016;6:28910.
303. Qu Q-X, Xie F, Huang Q, Zhang X-G. Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;43(5):1893–906.
304. Polioudaki H, Chantziou A, Kalyvianaki K, Malamos P, Notas G, Mavroudis D, u. a. Nuclear localization of PD-L1: artifact or reality? *Cell Oncol Dordr.* April 2019;42(2):237–42.
305. Callan HG, Randall JT, Tomlin SG. An Electron Microscope Study of the Nuclear Membrane. *Nature.* Februar 1949;163(4138):280–280.

306. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J.* Februar 2015;282(3):445–62.
307. Hung M-C, Link W. Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci.* 15. Oktober 2011;124(Pt 20):3381–92.
308. Mor A, White MA, Fontoura BMA. Nuclear trafficking in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* Juni 2014;28:28–35.
309. Herzog A, Bian Y, Vander Broek R, Hall B, Coupar J, Cheng H, u. a. PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 antitumor activity is enhanced with induction of wild-type TP53 in human xenograft and murine knockout models of head and neck cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. Juli 2013;19(14):3808–19.
310. Lattanzio L, Tonissi F, Monteverde M, Vivenza D, Russi E, Milano G, u. a. Treatment effect of buparlisib, cetuximab and irradiation in wild-type or PI3KCA-mutated head and neck cancer cell lines. *Invest New Drugs.* April 2015;33(2):310–20.
311. Zhao L, Li C, Liu F, Zhao Y, Liu J, Hua Y, u. a. A blockade of PD-L1 produced antitumor and antimetastatic effects in an orthotopic mouse pancreatic cancer model via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *OncoTargets Ther.* 2017;10:2115–26.
312. Zhang Y, Zhang J, Xu K, Xiao Z, Sun J, Xu J, u. a. PTEN/PI3K/mTOR/B7-H1 signaling pathway regulates cell progression and immuno-resistance in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* Oktober 2013;60(127):1766–72.
313. Murugan AK. Special issue: PI3K/Akt signaling in human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:1–2.
314. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, u. a. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 9. Februar 2006;354(6):567–78.
315. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer [Internet].* 19. Februar 2019 [zitiert 25. August 2020];18. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6379961/>
316. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* Dezember 2005;4(12):988–1004.
317. Anderson JL, Park A, Akiyama R, Tap WD, Denny CT, Federman N. Evaluation of In Vitro Activity of the Class I PI3K Inhibitor Buparlisib (BKM120) in Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas. *PloS One.* 2015;10(9):e0133610.
318. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 22. November 2013;6:88.
319. Xue S, Hu M, Li P, Ma J, Xie L, Teng F, u. a. Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma. *Oncotarget.* 25. Juli 2017;8(30):49702–12.

## DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Personen, die an meinem Projekt beteiligt waren, für die wundervolle Zeit und die tolle Zusammenarbeit!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, für die Möglichkeit am Lehrstuhl promovieren zu dürfen und alle Unterstützung darüber hinaus.

Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl, meinem Betreuer, für die Vergabe des spannenden Themas, die Erläuterung der klinischen Hintergründe, die Organisation der Rahmenbedingungen und dafür, jederzeit für Fragen zur Verfügung zu stehen.

PD Dr. Richard Bauer, Laborleiter und meinem erstem Mentor, für die fabelhafte Unterstützung, die wertvollen Ideen und die konstruktive Kritik, welche die erfolgreiche Durchführung des Projekts ermöglicht haben.

Prof. Dr. Gero Brockhoff, meinem zweiten Mentor, für die Bereitstellung des FACS Canto II und die Expertise bei der Planung von FACS-Experimenten, ebenso für die konstruktive Teilnahme an den Kolloquien und die wertvollen Ideen zur Weiterführung des Projekts.

Brigitta Hauer, MTA der AG Bauer, für die umfassende und ausführliche Einarbeitung, die Geduld, dem Austüfteln neuer Protokolle und die tolle Unterstützung egal, wo's gebrannt hat.

Gerhard Piendl, MTA der AG Brockhoff, für die wertvolle und auch tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung von FACS Experimenten und der Etablierung neuer Protokolle und Auswertungen.

Irene Stancev, zur damaligen Zeit zahnmedizinische Doktorandin der AG Bauer, für die Zusammenarbeit an der Etablierung des Modells, dem PD-L1-Knockdown und der PD-L1-Überexpression sowie der Durchführung des Experiments zur Ermittlung der Rolle von PD-L1 für die Proliferation in RR Zelllinien.

Melanie Streller, zu damaligen Zeit zahnmedizinische Doktorandin der AG Bauer, für die Zusammenarbeit an den Experimenten zur Ermittlung der zellulären Lokalisation von PD-L1, der Zellfraktionierung und der Bestimmung des Selektionsvorteils von PD-L1 für RS Zelllinien nach Radiatio mittels DAB-Färbung.

Kristian Pscheidl, zu damaligen Zeit humanmedizinischer Doktorand der AG Bauer, für die Zusammenarbeit an der Etablierung optimaler Sphäroid-Zellzahlen und der Durchführung von Migrations- und Invasionsassays nach Boyden.

Dr. Jonas Eichberger, Zahnmediziner und aktuell humanmedizinischer Doktorand der AG Bauer, für die Zusammenarbeit an der Etablierung der transienten Transfektion in Sphäroiden, der Durchführung der Migrations- und Invasionsassays nach Boyden, der Migration von Sphäroiden auf unterschiedlichen Matrices, der Bestimmung von PD-L1-abhängigen EMT-Markern in 3D-Zellkultur und der RT2 qPCR-Genexpressionsanalyse zellmotilitäts-assoziiertes Gene.

Dr. Mathias Fiedler, Zahnmediziner und aktuell humanmedizinischer Doktorand der AG Bauer, für die Zusammenarbeit bei der Etablierung des PI3K-Inhibitors Buparlisib, der Ermittlung des Einflusses von Buparlisib auf Proliferation, Akt-Aktivität, PD-L1-Gesamtprotein- und Membranexpression. Ebenso für die Zusammenarbeit an der Ermittlung des Einflusses von Buparlisib in Kombination mit Bestrahlung auf die PD-L1 Expression, genauso wie die Ermittlung der PD-L1-abhängigen Verringerung der Proliferation durch Buparlisib.

Martin Wetzl, aktuell zahnmedizinischer Doktorand der AG Bauer, für die Zusammenarbeit an dem Experiment zur Bestimmung der Konfluenz-abhängigen Expression von PD-L1 und den Folgeexperimenten zur Bestimmung der zellzyklusabhängigen Expression von PD-L1.

PD Dr. Matthias Hautmann und dem Team der Abteilung für Strahlentherapie, für die durchweg unkomplizierte und auch manchmal sehr spontane Terminfindung für Bestrahlungen und die freundliche Unterstützung bei der Bestrahlung der Zellen.

Prof. Philipp Beckhove für die Bereitstellung des InCuCyte und ganz besonders Antonio Sorrentino und Ayse Nur Menevse der AG Beckhove für die Unterstützung bei der Durchführung und der Analyse der InCuCyte Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken für die wertvolle Unterstützung und den passenden Ausgleich nach unzähligen Stunden im Labor. Ich danke euch herzlich, dass ihr mir immer den Rücken frei haltet und auf euch immer Verlass ist!

## SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, **Schulz, Daniela**, geboren am **05.02.1988** in **Augsburg**, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift