

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR MUND-, KIEFER-, GESICHTSCHIRURGIE  
*Klinikdirektor Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Selektionsvorteil von Kopf- und Halstumorzellen  
durch differenzielle Lokalisation und Expression von PD-L1  
nach Radiatio

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Melanie Streller*

2020



AUS DER ABTEILUNG  
FÜR MUND-, KIEFER-, GESICHTSCHIRURGIE  
*Klinikdirektor Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Selektionsvorteil von Kopf- und Halstumorzellen  
durch differenzielle Lokalisation und Expression von PD-L1  
nach Radiatio

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Melanie Streller*

2020

|                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dirk Hellwig    |
| 1. Berichterstatter:        | PD Dr. Richard Bauer      |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Denitsa Docheva |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 07.05.2021                |

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1.1 Orales Plattenepithelkarzinom.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.1.2 Symptome, Lokalisation und Diagnose von Kopf- und Halstumoren .....</b>       | <b>10</b> |
| <b>1.1.3 Therapie und Prognose von Kopf- und Halstumoren.....</b>                      | <b>11</b> |
| <b>1.2 Immunsystem .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.3 Immuncheckpoint PD-1/PD-L1 .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>1.3.1 Molekulare Struktur und Beschreibung von PD-1/PD-L1/PD-L2 .....</b>           | <b>16</b> |
| <b>1.3.2 PD-1/PD-L1 bei körpereigenen gesunden Zellen .....</b>                        | <b>17</b> |
| <b>1.3.3 PD-1/PD-L1 bei Krebszellen .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>1.4 Intrinsische Funktionen von PD-L1 .....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>1.5 Auswirkung einer Strahlentherapie auf PD-L1-Expression bei Krebszellen.....</b> | <b>20</b> |
| <b>1.6 Immuntherapie durch Checkpointinhibitor-Blockade .....</b>                      | <b>21</b> |
| <b>1.6.1 Medikamente, Indikationen, Aufbau und Dosierung .....</b>                     | <b>21</b> |
| <b>1.6.2 Nebenwirkungen .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>1.6.3 Prognose .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>                              | <b>25</b> |
| <b>2. Material.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2.1 Zelllinien.....</b>   | <b>26</b> |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.2     | Kulturmedium.....                                    | 26 |
| 2.3     | Kit.....   | 27 |
| 2.4     | Reagenzien und Lösungen.....                         | 27 |
| 2.5     | Verbrauchsmaterialien .....                          | 31 |
| 2.6     | Geräte.....  | 32 |
| 2.7     | Puffer und Lösungen .....                            | 34 |
| 2.7.1   | Zellkultur.....                                      | 34 |
| 2.7.2   | Sulfo-NHS-SS-Biotin.....                             | 34 |
| 2.7.3   | Western Blot .....                                   | 35 |
| 2.7.3.1 | Proteinisolierung und –konzentrationsbestimmung..... | 35 |
| 2.7.3.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ..... | 36 |
| 2.7.3.3 | Primärantikörper .....                               | 38 |
| 2.7.3.4 | Sekundärantikörper .....                             | 39 |
| 2.7.4   | Histologie.....                                      | 40 |
| 2.8     | Software.....  | 40 |
| 3.      | Methoden .....                                       | 41 |
| 3.1     | Zellkultur .....                                     | 41 |
| 3.1.1   | 2D-Zellkultur .....                                  | 41 |
| 3.1.2   | Bestimmung der Zellzahl .....                        | 41 |
| 3.2     | Bestrahlung der Kopf- und Halstumorzellen.....       | 42 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>3.3</b> | <b>Transiente Transfektion von Plasmid DNA .....</b>                              | <b>42</b> |
| 3.3.1      | Transiente PD-L1 Überexpression in PCI 9.....                                     | 42        |
| 3.3.2      | Aussaat transfizierter Zellen und Bestrahlung.....                                | 45        |
| <b>3.4</b> | <b>Fixierung und DAB-Färbung.....</b>   | <b>47</b> |
| 3.4.1      | Fixierung mit Paraformaldehyd .....   | 47        |
| 3.4.2      | DAB-Färbung .....   | 47        |
| 3.4.3      | HE-Färbung.....   | 49        |
| <b>3.5</b> | <b>Sulfo-NHS-SS-Biotin .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Proteinisolation verschiedener Zellfraktionen.....</b>                         | <b>52</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Proteinbiochemie .....</b>   | <b>54</b> |
| 3.7.1      | Proteinkonzentrationsbestimmung .....   | 54        |
| 3.7.2      | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....  | 55        |
| 3.7.2.1    | Probenvorbereitung.....   | 56        |
| 3.7.2.2    | Gelelektrophorese .....   | 56        |
| 3.7.3      | Western Blot .....  | 56        |
| <b>4.</b>  | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>61</b> |
| 4.1        | PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien als Selektionsvorteil nach der Bestrahlung.. | 61        |
| 4.1.1      | Etablierung der DAB-Färbung zur Bestimmung PD-L1-positiver Zellen .....           | 62        |
| 4.1.2      | Überexpression von PD-L1 durch Interferon $\gamma$ .....                          | 62        |
| 4.1.3      | Überexpression von PD-L1 durch transiente Plasmid-Transfektion .....              | 63        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.1.4 | Bestimmung des Anteils PD-L1-positiver Zellen nach Bestrahlung .....  | 64 |
| 4.1.5 | PD-L1-Expression als Selektionsvorteil für radiosensitive HNSCC-Zelllinien nach Radiatio .....                  | 65 |
| 4.1.6 | Morphologische Änderungen nach PD-L1-Überexpression radiosensitiver HNSCC-Zelllinien .....                      | 68 |
| 4.2   | Ermittlung der PD-L1-Membranexpression nach Selektion von Membranproteinen durch Präzipitation mit Biotin ..... | 69 |
| 4.2.1 | Etablierung der Selektion von Membranproteinen durch Präzipitation mit Biotin .....                             | 70 |
| 4.2.2 | Veränderung der PD-L1-Membranexpression in HNSCC-Zelllinien nach Radiatio .....                                 | 71 |
| 4.3   | PD-L1 Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten von HNSCC-Zelllinien ..                              | 73 |
| 4.3.1 | Überprüfung der Reinheit nach Auftrennung verschiedener Zellkompartimente mit dem ProteoExtract Kit .....       | 73 |
| 4.3.2 | Expression von PD-L1 vor und nach Radiatio im Zellkern und im Zytoplasma.                                       | 74 |
| 5.    | Diskussion .....  | 77 |
| 5.1   | Vorarbeiten als Grundlage für dieses Projekt .....  | 77 |
| 5.2   | PD-L1-Expression als Selektionsvorteil bei Bestrahlung .....  | 78 |
| 5.2.1 | Immunzytochemische DAB-Färbung .....  | 78 |
| 5.2.2 | Verstärkte PD-L1-Expression durch Interferon $\gamma$ .....   | 78 |
| 5.2.3 | Schutz vor Interferon-Toxizität durch PD-L1-Expression .....  | 79 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 5.2.4   | Erhöhter relativer Anteil PD-L1-positiver Zellen nach Bestrahlung .....                                       | 79 |
| 5.2.5   | Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation .....  | 80 |
| 5.2.6   | Einfluss von PD-L1 auf die Reparatur von DNA-Schäden nach Radiatio .....                                      | 80 |
| 5.2.7   | Differenzielle Zellmorphologie und veränderte Zellmotilität durch PD-L1 .....                                 | 82 |
| 5.3     | Lokalisation von PD-L1 nach Radiatio .....  | 84 |
| 5.3.1   | Expression von PD-L1 an der Zellmembran .....   | 84 |
| 5.3.2   | Veränderte PD-L1-Expression der Tumorzellen nach der Bestrahlung auf der Zellmembran .....                    | 84 |
| 5.3.3   | PD-L1-Expression in unterschiedlichen Zellkompartimenten der HNSCC-Zelllinien .....                           | 86 |
| 5.3.3.1 | Fraktionierung der einzelnen Zellkompartimente mittels ProteoExtract Kit .....                                | 86 |
| 5.3.3.2 | PD-L1-Expression in Zytoplasma- und Kernkompartiment bei bestrahlten und unbestrahlten HNSCC-Zelllinien ..... | 87 |
| 6.      | Zusammenfassung .....   | 89 |
| 7.      | Abbildungsverzeichnis .....   | 90 |
| 8.      | Abkürzungsverzeichnis .....   | 92 |
| 9.      | Tabellenverzeichnis .....   | 96 |
| 10.     | Literaturverzeichnis .....  | 98 |
| 11.     | Danksagung .....  |    |
| 12.     | Lebenslauf .....  |    |

# 1. Einleitung

## 1.1 Orales Plattenepithelkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Ein zentrales Thema in der Krebsforschung stellen die Kopf- und Halstumoren dar, welche weltweit zu den zehn häufigsten Krebsarten zählen (1). Den größten Teil davon macht mit über 90 % das orale Plattenepithelkarzinom (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) aus, das mit über 630.000 Neuerkrankungen pro Jahr global eine der sechs häufigsten Tumorformen darstellt (2) (3). Dabei sind Männer mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen und die Inzidenzrate liegt in Industrieländern auch deutlich höher als in Entwicklungsländern (4). Im Durchschnitt liegt das Alter zum Zeitpunkt des Befunds bei 63 Jahren (5). Ursächlich für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms ist die Entartung von Keratinozyten des Plattenepithels der Mundschleimhaut (6) (7).

Diese Veränderung ist ein komplexer Prozess, der über mehrere Stufen zunehmender Proliferation und Dysplasie bis hin zum Karzinom verläuft.

Dieses Geschehen lässt sich unterteilen in eine Phase der Hyperproliferation der Zellen, in der es zu einem Verlust der strengen Zellzyklusregulation kommt und eine Hyperplasie des Gewebes daraus resultiert. Daraufhin folgt durch eine genetische Veränderung der DNA ein Stadium mit verschiedenen dysplastischen Formen, bei denen es einerseits zu einer Änderung der Zellstruktur und –morphologie, andererseits zum Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene und zur Aktivierung von Onkogenen kommt (8). Abschließend durchbrechen die entarteten Zellen die Basalmembran, was man dann als invasiven Krebs bezeichnet (2). Ein bedeutendes Tumorsuppressorgen in der Entstehung einer Neoplasie stellt das TP53 dar, welches regulär über den entsprechenden Transkriptionsfaktor p53 für die Reparatur der DNA oder die Apoptose der Zelle bei starker Genomschädigung sorgt. Bei einer Mutation von p53, kann es seine Aufgaben nicht mehr erfüllen und die veränderte Zelle teilt sich weiterhin (9). Ein weiteres relevantes Tumorsuppressorprotein ist p16, welches durch das CDKN2-Gen kodiert wird. Die Inaktivierung dieses Gens bei einer Tumorneuentstehung führt zu einem Wachstumsvorteil der dysplastischen Zellen (10). Eine Mutation des Transkriptionsfaktors p53 wurde in über 70 % der Kopf- und

Halstumoren, eine Veränderung des Tumorsuppressorproteins p16 sogar in über 80 % der Kopf- und Halstumoren vorgefunden (9) (10).

Ein weiterer genetischer Grund für die hohe und unbegrenzte Replikationsrate von entarteten Zellen ist die erhöhte Aktivität der Telomerase. Bei der regulären Fission wird das Telomer, eine spezifische Struktur, die sich an beiden Enden jedes Chromosoms befindet, verkürzt und die Teilungsanzahl der Zelle damit beschränkt. Das Telomerase-Enzym dagegen bewirkt eine Verlängerung des Telomers und macht damit eine stark erhöhte und fast unbeschränkte Replikationsrate der veränderten Zellen möglich (11).

Zusätzlich spielt auch bei über 80 % der Kopf- und Halstumoren die Überexpression des Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR eine Rolle im Hinblick auf eine schlechtere zukünftige Heilungsprognose (12).

Diese irreversiblen Schädigungen des Genoms können durch verschiedene Risikofaktoren ausgelöst werden. Dazu zählen zum einen Alkoholabusus, Zigarren-/ Zigarettenrauch, aber auch der Konsum von Kautabak und der im asiatischen Bereich verbreiteten Arekanuss. Dennoch kann ein ehemaliger Raucher, nach circa 10 Jahren Rauchfreiheit, ein ähnlich niedriges kanzerogenes Risiko erreichen wie ein Nichtraucher (13).

Ein anderer wesentlicher Aspekt ist die Infektion mit onkogenen humanen Papillomaviren (HPV), welche in High-Risk-Typen wie HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 45 und Low-Risk-Typen wie HPV 6 aufgeteilt werden können (14) (15). Besonders die High-Risk-Typen sind bei der Entstehung von malignen Neoplasien von Bedeutung. Durch den Einbau des viralen Erbguts in die Wirtszelle kommt es zur Synthese viraler Onkoproteine E6 und E7 (16). Diese führen durch die Inaktivierung zum einen von p53 und zum anderen von pRB (Retinoblastom-Protein), welches für die Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt, zu einer Inhibierung von Tumorsuppressorproteinen (17) (18).

Einen weiteren Risikofaktor stellen chronische Entzündungen und die damit verbundene erhöhte Telomeraseaktivität dar (11). Dabei spielen präkanzeröse Läsionen wie die mukokutane Entzündung bei einem oralen Lichen ruber planus eine große Rolle (19). Darüber hinaus wird in der Literatur ein möglicher Zusammenhang zwischen einer chronischen Entzündung um ein Implantat (Periimplantitis) und dem Entstehen eines oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben (20).

Weitere sekundäre Risikofaktoren sind eine Infektion mit HIV (21), immunsupprimierende Medikation nach einer Organtransplantation (22) und die Erbkrankheit Fanconi-Anämie insbesondere nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (23).

### **1.1.2 Symptome, Lokalisation und Diagnose von Kopf- und Halstumoren**

Eine genaue visuelle Kontrolle der Mundschleimhaut, sollte routinemäßig bei jeder zahnärztlichen Untersuchung erfolgen, um Veränderungen frühzeitig zu erkennen. Denn häufig stellen sich präkanzeröse Läsionen anfänglich nur optisch andersartig ansonsten jedoch symptomlos dar, haben aber ein erhöhtes Potential zu oralen Plattenepithelkarzinomen zu transformieren (24). Vorläuferläsionen können unterschiedliche Erscheinungsbilder aufweisen. Einerseits können sie sich durch weißliche Veränderungen in Form einer Leukoplakie, durch flächige Rötungen als Erythroplakie und andererseits als Mischform gekennzeichnet durch leukoplake und gerötete Areale als Erythroleukoplakie äußern (14). Des Weiteren sind auch der orale Lichen Planus, charakterisiert durch die Wickham-Streifung, die in Form von feinen netzartigen weißlichen Linien erscheint und die orale submuköse Fibrose als prämaligne Läsionen einzuordnen (14) (25).

Eine auffällige betroffene Fläche, sollte spätestens nach 3 Wochen heilen und die Symptome abklingen, anderweitig sollte diese Stelle als potentiell maligne eingestuft und genauer untersucht werden. Hierbei ist eine Entnahme des veränderten Gewebes und die histologische Analyse und Auswertung davon der Goldstandard in der Diagnostik (26).

Patienten/-innen mit einer fortgeschrittenen maligne transformierten Veränderung bemerken meistens einige Auffälligkeiten wie Schluck- und Kaubeschwerden, Dysarthrie und Schmerzen (14) (26). Häufig treten auch Parästhesien bei Infiltration der Nerven, ein schlechterer Halt eines herausnehmbaren Zahnersatzes, Fisteln, Ohrenscherzen, Zahnlockerungen oder eine länger nicht heilende Extraktionswunde auf (26) (24). Im äußeren Erscheinungsbild erkennt man bei Kopf- und Halstumoren häufig einen Ulcus und die Abgrenzung zu gesunden Nachbarstrukturen fällt schwer. Palpatorisch kann man eine Verhärtung des Gewebes ertasten (14).

Überwiegend tritt das orale Plattenepithelkarzinom an der Zunge, insbesondere im lateralen und ventralen Bereich, und am Mundboden auf. Zudem findet man es auch auf der Unterlippe, der Wangenschleimhaut, der Gingiva, im retromolaren Bereich und vereinzelt auch am harten Gaumen vor (14) (24).

Nach dem histologisch bestätigten Befund folgen zur Stadienbestimmung weitere bildgebende Verfahren, wie die Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie, um die Größe und die Ausbreitung in die benachbarten Strukturen einschätzen und beurteilen zu können. Bei Verdacht auf Fernmetastasen kann weiterhin eine Positronen-Emissions-Tomographie mit Fluoro-2-Desoxyglucose (27) durchgeführt werden (26). Dadurch kann das orale Plattenepithelkarzinom entsprechend der TNM-Klassifikation anhand der Größe und Ausbreitung des Primärtumors, der Lymphknotenbeteiligung und der Präsenz von Fernmetastasen eingeordnet werden (26).

### **1.1.3 Therapie und Prognose von Kopf- und Halstumoren**

Welche Form der Behandlung gewählt wird, hängt von verschiedenen Aspekten ab. Zum einen sind die Größe, Invasionstiefe und damit verbunden das Stadium des Primärtumors, die Beurteilung der Lymphgefäße, des Sentinel-Lymphknotens und der zervikalen Lymphknoten und die Lokalisation des Malignoms relevant für die Therapiefindung. Zum anderen nehmen auch der Allgemeinzustand der/des Patientin/en und die Toleranz und Akzeptanz gegenüber den entsprechenden Nebenwirkungen der verschiedenen Therapiemethoden großen Einfluss auf die Entscheidung (28) (29).

Bei kleineren Kopf- und Halstumoren im Stadium 1 oder 2 ist die Therapie der Wahl eine Operation (28). Das primäre Ziel ist es, eine vollständige chirurgische Exzision des veränderten Gewebes mit tumorfreien Resektatsrändern und geringe bis keine Langzeitfolgen zu erreichen. Dies geht zusammen mit einer erhöhten Überlebensrate und einer verminderten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs (29). In höheren Stadien und bei fortgeschrittenen Karzinomen kombiniert man häufig eine chirurgische Behandlung mit einer unterstützenden Radio- oder Radiochemotherapie (26). Zusätzlich wird bei einem Malignom im Stadium 1 ab einer Invasionstiefe von größer gleich 4 mm und in den Stadien 2 – 4 zu einer Entfernung der Lymphknoten im zervikalen Bereich geraten. In welchem Umfang und bis zu welchen anatomischen

Grenzen die Halslymphknoten exzidiert werden, bestimmen Faktoren wie die Lage und Infiltrationstiefe des Primärtumors, sowie histopathologische Merkmale wie der Differenzierungsgrad und das Wachstumsmuster (30) .

Eine adjuvante Behandlung im Rahmen einer Radio- oder Radiochemotherapie wird einerseits bei Kopf- und Halstumoren im Stadium 3 und 4, bei spezifischen histologischen Befunden des Karzinoms, bei Inoperabilität (28) und bei Lymphknotenmetastasen durchgeführt (29). Chemotherapeutika, die dabei zur Verwendung kommen sind Cisplatin (26), Carbo-Platin, 5-Fluorouracil, Docetaxel, Paclitaxel und Methotrexat (28). Die Radiotherapie wird dabei durchschnittlich mit einer Gesamtdosis von 70 Gray (Gy) über 7 Wochen und postoperativ mit einer Gesamtdosis im Mittel von 60 – 66 Gy durchgeführt (27). Bei der Bestrahlung und Chemotherapie treten jedoch auch einige Nebenwirkungen auf, da auch gesunde Zellen irreversibel geschädigt werden. Dabei kann es einerseits zu Nekrosen des Kieferknochens, Karies oder Xerostomie (27), andererseits zu Entzündungen der Schleimhaut, Haarausfall oder Störungen der Hämatopoese kommen (28).

Weitere Ansätze sind zielgerichtete Therapien mit monoklonalen Antikörpern. Dazu zählt Cetuximab, welches spezifisch den EGF-Rezeptor erkennt und bindet (31). Der Wachstumsfaktor-Rezeptor wird bei über 80 % der Kopf- und Halstumoren überexprimiert (26) und durch dessen Inhibition wird die Migration und Invasion der oralen Krebszellen gehemmt, wodurch die Überlebenszeit der Patienten/-innen beträchtlich ansteigt (28) (31).

Eine andere zielgerichtete Behandlung ist die Immuntherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Durch die Hemmung der Rezeptor-Ligand-Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 mittels geeigneter Inhibitoren wird die Blockierung des Immunsystems verhindert und die Abwehrzellen können das Karzinom angreifen (31) (32). Zugelassene Medikamente dieser Behandlung sind die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, auf welche in Kapitel 1.4.1 genauer eingegangen wird. Nebenwirkungen, die aufgrund von Autoimmuntoxizitäten bei dieser Therapiemethode auftreten können, sind Hautausschläge, Durchfall, Hepatitis oder eine Entzündung der Schilddrüse (31).

Trotz dieser zahlreichen Therapiemöglichkeiten und der intensiven Forschung an neuartigen Behandlungen hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahren nicht signifikant erhöht und liegt bei 50 – 55 %. Damit ist die Letalität des oralen Plattenepithelkarzinoms relativ hoch (25). Entscheidend für den Heilungsverlauf und

die Bewältigung der Erkrankung sind sowohl der Zeitpunkt der Diagnose und damit verbunden das Stadium des Malignoms und das Auftreten von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (27). Fernmetastasen treten in 7 – 18 % der Fälle auf und sind überwiegend in der Lunge zu finden, kommen aber auch in den Knochen oder der Leber vor (33).

## 1.2 Immunsystem

Die regulär ablaufende Abwehrreaktion des Organismus bei eingedrungenen Viren oder Bakterien kann man in die angeborene und die erworbene Immunantwort unterteilen (34). Hierbei gibt es zum einen humorale und zum anderen zelluläre Komponenten die auf verschiedene Weisen zur Körperabwehr beitragen. Die erste physische Barriere für Erreger um in den Organismus zu gelangen, stellen die Haut und die Schleimhäute dar. Das Integument bietet durch den Schichtaufbau einen mechanischen Schutz. Die Schleimhaut im Magen und den Atemwegen vermindert die Anzahl eindringender Keime durch einen niedrigen sauren pH-Wert, und hydrolytische Enzyme wie zum Beispiel Lysozym (35). Einen weiteren Bestandteil der angeborenen humoralen Immunantwort bildet das Komplementsystem. Hierbei führt eine proteolytische Kaskade von Serumproteinen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und zur Lyse der pathogenen Zellen durch einen Membranangriffskomplex. Daneben werden Immunglobuline IgM von Plasmazellen synthetisiert und reagieren mit fremden Antigenen. Sie können unter Anderem tumorspezifische Antigene wie CFR-1 erkennen und die Apoptose der veränderten Zellen induzieren (35). Zu der zellulären unspezifischen Immunabwehr zählen dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten. Diese erfüllen nach Interaktion des Fc-Rezeptors auf ihrer Oberfläche mit Immunglobulinen und den infizierten Zellen unterschiedliche Effektorfunktionen. So können natürliche Killerzellen einerseits infizierte Zellen abtöten so wie andererseits Zytokine wie beispielsweise Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  produzieren und freisetzen. Diese Zytokine dienen sowohl zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen als auch zur Steigerung der Zytotoxizität (36). Des Weiteren können Makrophagen und polymorphkernige Granulozyten opsonisierte Erreger phagozytieren, die Antigene

über Histokompatibilitätskomplexe 1 und 2 (MHC) auf ihrer Oberfläche präsentieren (36) und damit die adaptive Immunantwort aktivieren und regulieren (35).

Zur zellulären adaptiven Immunabwehr zählen die T- und B-Lymphozyten. Die T-Zellen entwickeln sich im Thymus und können aktiviert werden und als zytotoxische T-Zellen die Zielzelle abtöten oder als T-Helferzellen fungieren und verschiedenen Funktionen ausführen. Dabei können sie durch bestimmte Signale die Reaktion der B- und T-Zellen verstärken, phagozytierende Abwehrzellen aktivieren und die Immunantwort regulieren, um Gewebeschäden und Autoimmunerkrankungen zu vermeiden (37). Die T-Zell-Aktivierung verläuft über ko-stimulatorische Signale und die Interaktion des T-Zell-Rezeptors auf der Membran des T-Lymphozyten mit einem Antigen, welches auf einem MHC-Rezeptor durch eine antigenpräsentierende Zelle exponiert wird. Die daraus resultierende Bildung einer immunologischen Synapse führt zu einer Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten des T-Zell-Rezeptors durch eine Tyrosinkinase. Daraufhin werden Adaptermoleküle rekrutiert und eine folgende Signalkaskade bewirkt eine Sekretion der T-Helferzelle von IFN  $\gamma$  und Interleukin-2. Des Weiteren erfolgt durch die immunologische Synapse eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Diese können dabei innerhalb weniger Minuten die Apoptose der Zielzelle auslösen. Dazu setzen sie einerseits Granula mit Perforin und Serinproteinasen intrazellulär in der infizierten Zelle frei, welche daraufhin überlebenswichtige Proteine der Zielzelle zerstören. Andererseits exprimieren die T-Zellen gleichzeitig den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche und induzieren durch die Bindung an Fas auf der infizierten Zelle den programmierten Zelltod (37).

Die B-Zellen stellen den zweiten Bestandteil der zellulären erworbenen Immunabwehr dar und bilden gleichzeitig die Grundlage der humoralen adaptiven Immunreaktion. Sie können durch ihren B-Zell-Rezeptor auf der Membran an fremde Antigene binden. Daraufhin phagozytiert der B-Lymphozyt das Antigen und präsentiert Teile davon auf MHC-Molekülen an der Oberfläche. Sobald dieser MHC-Komplex von einer T-Helferzelle erkannt wird, kommt es durch eine Immunglobulinrezeptorvernetzung zur Aktivierung der B-Zelle durch Signale der T-Helferzelle und daraufhin zur Wanderung von den B-Lymphozyten in ein Keimzentrum. Hier beginnt die aktivierte Zelle mit der Proliferation und differenziert sich zu einer Plasmazelle, um passende lösliche Antikörper zu produzieren, welche die Grundlage für das spezifische humorale Immunsystem konstituieren. Ein Teil der



B-Zellen entwickelt sich nach dem Antigenkontakt zu Gedächtniszellen und kann immer wieder neu aktiviert werden (37).

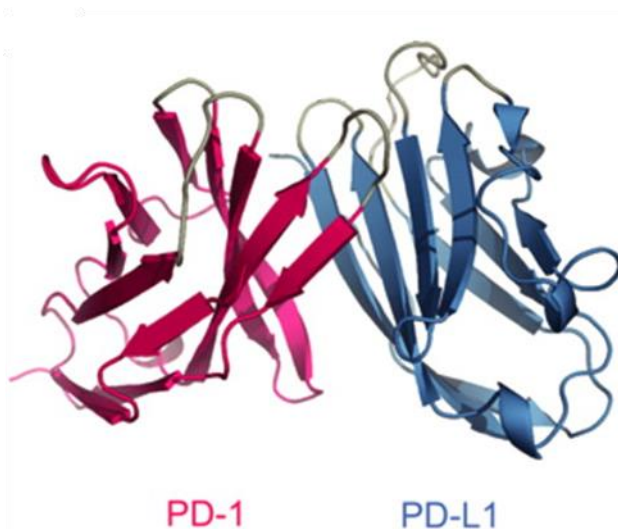
Einige Antikörper können dagegen auch T-Zell-unabhängig gebildet werden. Dabei werden B-Zellen allein durch einen Antigenkontakt aktiviert und die Antikörperproduktion induziert. Diese Antigene werden in TI-Typ-1-, wie beispielsweise pflanzliche Lektine, und TI-Typ-2-Antigene unterteilt. Zur Zweiteren Gruppe zählen Makromoleküle wie Polysaccharide oder polymerisierte Proteine, welche an membranständige B-Zell-Immunglobulinrezeptoren binden und durch eine Kreuzvernetzung Signale zur Aktivierung auslösen (37).

### **1.3 Immuncheckpoint PD-1/PD-L1**

Das Immunsystem des Körpers hat die Aufgabe infizierte und veränderte Zellen und schädliche eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen und abzuwehren. Im Gegensatz dazu ist es aber auch essentiell, dass gesunde körpereigene Gewebe toleriert und nicht angegriffen werden. Dieses anspruchsvolle Gleichgewicht der Abwehrzellen, wird durch sogenannte Immuncheckpoints, Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, kontrolliert, reguliert und moduliert. Hierbei führen einerseits ko-inhibierende Proteine eine Dämpfung und andererseits ko-stimulierenden Rezeptoren eine Steigerung und Stimulation der Immunantwort herbei. Hierbei wurden bisher etwa elf ko-inhibierende Rezeptoren wie beispielsweise CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA oder LAG-3 entschlüsselt (38). Dagegen wurden etwas weniger ko-stimulierende Proteine identifiziert. Rund sieben Checkpoints, wie zum Beispiel ICOS, GITR, OX40 oder CD28 regen das Immunsystem an (39). Ein wichtiger ko-inhibierender Immuncheckpoint ist PD-1/PD-L1, der auch in der Krebstherapie eine zentrale Rolle spielt (40). Der Ligand PD-L1 befindet sich bei verschiedenen Tumorarten auf der Membran der Krebszellen und kann an seinen passenden Rezeptor PD-1 auf der Zelloberfläche von Immunzellen binden (41). Durch seine hemmende und inhibierende Wirkung auf das Immunsystem, können die Abwehrzellen damit den Tumor nicht angreifen und eliminieren (42).

### 1.3.1 Molekulare Struktur und Beschreibung von PD-1/PD-L1/PD-L2

Der Programmed-Death-1-Rezeptor (PD-1) auch bekannt als CD279, hat eine atomare Masse von 50 – 55 kDa (43) und gehört zur B7/CD28-Superfamilie der Immunglobuline (44). PD-1 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das aus 288 Aminosäuren besteht (45). Es kann in drei verschiedene Bereiche unterteilt werden und setzt sich dabei aus einem extrazellulären Anteil mit einer IgV-Domäne, einer Transmembranregion und einem Bereich im Inneren der Zelle zusammen. Das intrazelluläre Segment wird aus zwei Tyrosinresten am Amino-Terminus und am Carboxy-Terminus gebildet (43). Das membranernahe Tyrosin konstituiert das auf Immunrezeptor Tyrosin-basierende Inhibitionsmotiv (ITIM) mit einer Länge von 26 Aminosäuren, der membranfernere Rest das Immunrezeptor Tyrosin-basierende Schaltmotiv (ITSM) mit einer Länge von 21 Aminosäuren (46) (47). Zusätzlich wird die IgV-Domäne durch einen Stiel, welcher eine Länge von circa 20 Aminosäuren besitzt, mit der Transmembranregion verbunden (48). Der inhibierende Rezeptor PD-1 (40) kann als gelöstes Protein vorliegen oder auf der Membran von zahlreichen Zellen des Immunsystems wie CD4+ aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Thymozyten, myelotischen Zellen, natürlichen Killerzellen (43), dendritischen Zellen und Makrophagen (44) exprimiert werden.



**Abbildung 1: Struktur von PD-1 und PD-L1**

Verändert nach Lin et al., 2008 (49)

Die passenden Liganden, die an PD-1 binden können, sind Programmed-Death-Ligand 1 (PD-L1)/CD274/B7-H1, welcher aus 290 Aminosäuren besteht und eine atomare Masse von 33 kDa hat (45), und Programmed-Death-Ligand 2 (PD-L2)/CD273/B7-DC (43). Die Liganden können sowohl in gelöster Form oder, wie größtenteils, membranständig als Transmembranglykoproteine mit einer extrazellulären IgC- und IgV-Domäne auftreten. PD-L1 findet sich zum einen auf Zellen mit hämatopoetischer Abstammung wie T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen und zum anderen auf Zellen des peripheren Gewebes wie des Herzens, Skelettmuskels, der Plazenta, Lunge, Niere, Leber (43), des Pankreas, der Plazenta, Hoden und auf vaskulären Endothelzelle (45). Die Expression von PD-L2 wurde auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie anderen Immunzellen und im peripheren Gewebe nachgewiesen (43). Obwohl nur in etwa 40 % der Aminosäuren von PD-L1 und PD-L2 identisch sind (43), können beide Liganden mit PD-1 interagieren, wobei die genaue Rolle von PD-L2 in der Literatur noch diskutiert wird (45). Für die Immuntherapie bei Kopf- und Halstumoren steht, trotz der 26-fach höheren Affinität von PD-L2 zu PD-1 (43), der PD-Ligand 1 im Fokus, da dieser bei mehr als 66 % der oralen Plattenepithelkarzinomen exprimiert wird (50).

### **1.3.2 PD-1/PD-L1 bei körpereigenen gesunden Zellen**

Ko-stimulierende und ko-hemmende Rezeptoren auf den Abwehrzellen modulieren die späte Immunantwort des Körpers. Dabei hat der Immuncheckpoint PD-1/PD-L1 eine inhibierende Funktion, wodurch das Immunsystem hemmend und suppressiv reguliert wird. Diese Kontrolle ist von großer Bedeutung, um eine Überaktivität der Abwehrzellen und damit verbundene Angriffe auf gesundes peripheres Gewebe zu verhindern (43). Dieser hemmende Signalweg sorgt somit für die Toleranz gegenüber den körpereigenen gesunden Zellen und die Vorbeugung von Autoimmunopathien (51). Fehlt der PD-1-Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen oder ist dieser gestört, kann dies zu pathologischen Reaktionen des Körpers gegen den eigenen Organismus führen und in verschiedenen Erkrankungen enden. Dazu zählt der Diabetes Typ 1, bei dem eine Autoimmunreaktion gegen die Insulin-bildenden Inselzellen des Pankreas auftritt (45). Weitere Resultate einer

fehlenden Toleranz des Immunsystems gegenüber den gesunden Zellen können Lupus-ähnliche Erkrankungen, Glomerulonephritiden oder Kardiomyopathien sein (40) (51). Die Interaktion von PD-1 mit dem passenden Liganden führt zu einer Konformationsänderung von PD-1 und zur Phosphorylierung des distalen Tyrosinrests, dem Immunrezeptor Tyrosin-basierenden Schaltmotiv (ITSM) durch die Src-Kinase (40) (43). Daraufhin wird das Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt und es folgt die Rekrutierung des Protein Src homology region 2 domain-containing phosphatase – 1 (SHP-1) und des SHP-2 (45). Im weiteren Verlauf ist vor allem die Tyrosinphosphatase SHP-2 von Bedeutung (47). Diese führt über weitere Signalwege zu einer verringerten Interleukin-2-Produktion und zu einer Dephosphorylierung von TCR-Signalmolekülen und damit zu einer fehlenden Reaktion der T-Zellen auf Antigene (43) (45). Dadurch wird die T-Zell-Aktivierung gedämpft und herunter reguliert (43). Des Weiteren werden die funktionelle T-Zell-Entwicklung, die T-Zell-Proliferation und die Zytokinproduktion inhibiert und begrenzt. Durch die Interaktion des Liganden mit dem programmierten Todesrezeptor resultiert außerdem eine Einleitung der Apoptose bei zytotoxischen T-Zellen und eine Hemmung des programmierten Zelltod bei regulatorischen T-Zellen (45). Damit hat der Signalweg über den PD-1/PD-L1 Immuncheckpoint eine Hemmung der Immunantwort zur Folge. Diese Reaktion spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Abwehr eines Transplantats und bei der Widerstandsfähigkeit und Resistenz von Tumorzellen (43).

### **1.3.3 PD-1/PD-L1 bei Krebszellen**

Der PD-1/PD-L1 Immuncheckpoint spielt eine wesentliche Rolle bei der Immunität der Tumorzellen gegen die körpereigenen T-Lymphozyten. Durch die Expression von PD-L1 auf der Membran der veränderten Zellen, können sich diese die inhibierende und negative Regulation des Checkpoints zu Nutze machen, indem sie mit PD-1 auf den zytotoxischen T-Zellen interagieren. Damit können sich die Krebszellen der Immunüberwachung und einem Angriff durch das Abwehrsystem entziehen (45) und induzieren dagegen eine Apoptose der zytotoxischen T-Lymphozyten und eine Hemmung der T-Zell Proliferation, indem das Cdc25A-codierende Gen herunter- und die Proteine p15 und p27 hochreguliert werden (52) (45). Des Weiteren kann eine funktionelle Erschöpfung der T-Lymphozyten auftreten, da durch den ständigen

Kontakt der T-Zellen zum Antigen die Expression von PD-1 und anderen inhibierenden Rezeptoren auf der Membran der T-Zellen deutlich ansteigt und diese damit keine stimulierenden Signale mehr empfangen können (52) (45). Damit wird die Fähigkeit des Immunsystems, die Tumorzellen zu bekämpfen, gemindert (45). PD-L1 kann bei verschiedenen Krebsarten auf der Zellmembran nachgewiesen werden. Dazu zählen Lungenkrebs, Darmkrebs, Leberzellkarzinome, Pankreaskarzinome (53), Hodgkin-Lymphome, Merkelzellkarzinome, Melanome, Nierenzellkarzinome, Blasenkrebs, Magenkrebs und das orale Plattenepithelkarzinom (52). Bei den Kopf- und Halstumoren konnte bei über 66 % der Tumoren PD-L1 dokumentiert werden (54).

Zusätzlich zeigen viele Untersuchungen ein verändertes Mikromilieu im Tumorgewebe. Dabei produzieren die Plattenepithelkarzinomzellen immunsuppressive Zytokine (17). Darüber hinaus findet man weitere Signalproteine, welche die PD-L1-Expression an der Oberfläche der Tumorzellen noch mehr verstärken. Der stärkste Induktor dieser Gruppe ist IFN  $\gamma$ , andere sind der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin 4 und 10 (52).

Daraus resultiert, dass das Karzinom nicht vom körpereigenen Immunsystem angegriffen und eliminiert werden kann und sich somit ungehindert unkontrolliert die veränderten Zellen teilen und der Tumor wächst.

#### **1.4 Intrinsische Funktionen von PD-L1**

Des Weiteren zeigt sich immer mehr, dass PD-L1 auch innerhalb der Tumorzellen unabhängig vom Immunsystem eine große Rolle spielt. Die Expression von PD-L1 bei Karzinomzellen korreliert mit der Zunahme des Tumorgades und damit gleichzeitig mit der Abnahme des Gesamtüberlebens (55). Dies äußert sich durch eine langsamere Zellproliferation bei Tumorzellen mit einer geringen PD-L1-Expression und damit verbunden ein langsames Wachstum des Karzinoms. Damit einhergehend induziert ein hoher PD-L1 Gehalt in Karzinomzellen eine stärkere Zellproliferation und damit ein schnelleres Tumorstadium (56). Ursächlich für diese PD-L1 vermittelte verstärkte Zellproliferation und Vermehrung ist die Erhöhung der Serin/Threonin-Kinase mTOR und die Interaktion von PD-L1 mit einzelnen Komponenten des mTOR-Signalnetzwerkes (55). Die Kinase mTOR reguliert grundsätzlich durch Bildung von mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und

mTOR-Komplex 2 (mTORC2) und weiteren Signalmolekülen das Zellwachstum, die Proliferation und die Motilität der Zellen (56). Durch den Verlust der Phosphatase PTEN innerhalb der Karzinomzellen, ein Enzym, welches als Tumorsuppressor fungiert, kommt es zu einer Erhöhung von mTOR. Daraufhin folgt eine Hochregulation der mTOR-Signalkaskade, wobei PD-L1 mit diesen Komponenten interagiert und deren Funktionen beeinflusst, woraus eine verstärkte Zellproliferation resultiert (55).

Darüber hinaus lässt sich eine Zunahme des Tumorgrades durch eine vermehrte Metastasierung der PD-L1-positiven Karzinome feststellen. Dabei zeigt sich, dass PD-L1 die Koloniebildung bei Tumorzellen induziert und die Migrationsfähigkeit der Zellen fördert und verstärkt, weil PD-L1 den epithelialen zu mesenchymalen Übergang der Karzinomzellen begünstigt. Diese mesenchymalen Eigenschaften befähigen die Zellen zu einer erhöhten Motilität und Migration und führen damit vermehrt zu Metastasen und einer schlechteren Gesamtüberlebensrate (57).

Weiterhin nimmt ein erhöhter PD-L1 Gehalt Einfluss auf ein verbessertes Überleben der Tumorzellen. Dabei bewirkt PD-L1 eine verminderte Abtötung der Zellen nach einer Chemotherapie, welche regulär durch eine Veränderung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signale durch die Zytostatika vermittelt wird (56).

## **1.5 Auswirkung einer Strahlentherapie auf PD-L1-Expression bei Krebszellen**

Bei einer Radiotherapie wird das bösartige Gewebe zielgerichtet mit hochenergetischen kurzwelligigen elektromagnetischen Wellen oder Elektronenstrahlung behandelt. Dabei bewirkt die ionisierende Strahlung entweder direkt oder indirekt durch ein entstandenes Sauerstoffradikal eine Veränderung der Erbinformation in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA und führt damit zur Nekrose oder Apoptose der Karzinomzellen (58). Die geschädigten Karzinomzellen versuchen über verschiedene Proteine und Signalwege die DNA zu reparieren. Auffallend ist dabei, dass die PD-L1-Expression bei verschiedenen Krebsarten nach einer Radiatio transient hochreguliert wird (59). Dabei zeigt sich, dass diese Reaktion beim Fehlen von Zellbestandteilen, welche bedeutend für die DNA-Reparatur sind, noch verstärkt auftritt. Dieser Effekt äußert sich exemplarisch bei Fehlen des BRCA2, ein im Zellkern vorkommendes Polypeptid (60). Zum

anderen wird der PD-L1 Gehalt innerhalb der Karzinomzellen bei der Depletion des Heterodimer-Proteinkomplexes Ku70/80 deutlich erhöht. Dieser Komplex bindet an die Doppelstrangbruchstellen der DNA und fördert die Rekrutierung einer nicht-homologen Endverknüpfung zur Reparatur (60). Dieser Wiederherstellungsmechanismus führt auf beiden Wegen zu einer PD-L1 Erhöhung über Vermittlung der Serin/Threonin-Kinase Chk1 (60).

## **1.6 Immuntherapie durch Checkpointinhibitor-Blockade**

Die Immuntherapie ist eine zielgerichtete Behandlung, bei welcher das körpereigene Abwehrsystem genutzt wird, um die Krebszellen zu bekämpfen (52). Dabei wird in die PD-1/PD-L1-Achse eingegriffen und die Interaktion des Liganden mit seinem Rezeptor blockiert. Daraus folgt eine verstärkte Aktivität und vermehrte Infiltration der T-Zellen in das Tumorgewebe und fördert die Krebszellphagozytose durch Makrophagen (40).

### **1.6.1 Medikamente, Indikationen, Aufbau und Dosierung**

Bislang gibt es zwei anerkannte Medikamente für die Immuntherapie des oralen Plattenepithelkarzinoms. Dazu zählen der PD-1 Inhibitor Nivolumab und der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab, welche von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen worden sind. Indikationsbereiche für diese Immuncheckpointinhibitoren sind Zweitlinientherapien von rezidierten oder metastasierten Kopf- und Halstumoren bei Erwachsenen, bei welchen während oder nach einer platinbasierten Chemotherapie eine weitere Progression des Karzinoms festgestellt worden ist (61). Pembrolizumab kann zusätzlich auch zur Erstlinienbehandlung bei rezidiertem oder metastasiertem oralen Plattenepithelkarzinom genutzt werden (62).

Bisher verlief die Standardtherapie in diesen Fällen nach dem EXTREME-Schema, welches sich aus einer chemotherapeutischen Behandlung mit Platin und 5-Fluorouracil und Cetuximab, einem zielgerichteten Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, zusammensetzt (63). Dabei wurde das mediane Gesamtüberleben deutlich erhöht, wobei allerdings mit einer signifikant hohen Toxizität der Wirkstoffe gerechnet werden musste (17). Im Vergleich dazu

bieten die neueren Immuncheckpointinhibitoren einen großen Vorteil, da sie ebenfalls eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit aufzeigen, die unerwünschten behandlungsbedürftigen Nebenwirkungen dagegen deutlich seltener sind (45). Durvalmab, Atezolizumab und Avelumab sind weitere Medikamente, die als PD-L1-Inhibitoren fungieren und gute Ergebnisse in Studien aufweisen, allerdings noch nicht für die Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms zugelassen sind (17).

Nivolumab und Pembrolizumab sind vollständig humane, monoklonale PD-1 spezifische Immunglobulin G4-Antikörper und haben eine sehr hohe Affinität zu den PD-1- Rezeptoren (61) (64). Sie werden künstlich hergestellt, indem ein anti-human-PD-1 Antikörper aus einer Maus isoliert wird und auf ein humanes stabilisiertes IgG4-Gerüst aufgebracht wird (62). Dies besteht aus zwei identischen schweren Polypeptidketten mit je 440 Aminosäuren und zwei identischen leichten Kappaketten mit je 214 Aminosäuren, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (61).

Die Immuntherapie kann entweder allein als Monotherapie verabreicht werden oder in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie (17). Die empfohlene Dosis bei einer Nivolumab-Monotherapie beträgt 3 Milligramm/Kilogramm (mg/kg) Körpergewicht und soll alle zwei Wochen über 60 Minuten (Min) intravenös appliziert werden (61). Bei Pembrolizumab ist die Dosis gewichtsunabhängig und beträgt 200 mg alle drei Wochen (62).

Patienten/-innen mit bereits bestehenden Autoimmunerkrankungen, chronischen Virusinfektionen, Organdysfunktionen, Hirnmetastasen und empfangenen Organtransplantaten gelten als kontraindiziert und sollten eine Alternativtherapie erhalten (65).

### **1.6.2 Nebenwirkungen**

Die Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs hat eine sehr geringe und weniger stark ausgeprägte Toxizität im Vergleich zu anderweitigen Behandlungsmethoden und es treten dabei seltener behandlungsbedürftige Nebenwirkungen des Schweregrades 3 - 5 auf (45) (17) (63). Dennoch kann diese Therapieform unerwünschte Ereignisse durch eine unspezifische Immunstimulation hervorrufen (65).



Eine der häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen ist die Müdigkeit. Diese tritt bei 16 – 42 % der Patienten/-innen auf. Ursächlich dafür können eine Hypothyreose, Hypophysitis oder Nebenniereninsuffizienz sein und sollten abgeklärt und kontrolliert werden (65). Schilddrüsenfunktionsstörungen wie Hypo-, Hyperthyreosen oder Entzündungen des Schilddrüsengewebes können circa 6 – 20 % der Patienten/-innen unter einer Anti-PD-1-Monotherapie entwickeln (65).

Bei etwa 30 – 40 % der Patienten/-innen kommt es nach PD-1-Inhibitorgabe zu dermatologischen Reaktionen. Dabei können sich auf dem Integument der Extremitäten und des Stammes makulopapulöse oder erythematöse Ausschläge, Urticaria, Ekzeme, bullöse Dermatosen oder lichenoidale Reaktionen auf den Schleimhäuten darstellen. Diese können von einem starken Juckreiz begleitet sein (65) (45).

Gelegentlich bei bis zu 25 % der behandelten Personen kann es nach Verabreichung des Wirkstoffes zu einer Infusionsreaktion kommen, welche sich durch grippeähnliche Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit und Dyspnoe abzeichnen kann (65).

Eine seltene, bis zu 10 % der Patienten/-innen betreffende, unerwünschte Arzneimittelwirkung bildet die Pneumonitis, welche sich vor allem durch Dyspnoe und Husten bemerkbar macht (65).

Bei etwa 1 - 3 % der therapierten Personen können sich circa 10 – 12 Wochen nach Beginn der Behandlung gastrointestinale Beschwerden in Form von Diarrhoe, Bauchschmerzen, Schleimdurchgang und Gewichtsverlust zeigen (65).

Hepatische Beschwerden können asymptomatisch bei wenigen Personen in Form einer Erhöhung der Alanin- und/oder Aspartat-Aminotransferase auftreten. Kaum entwickeln sich autoimmunähnliche Hepatitiden mit erhöhten Billirubinwerten und akuter Leberinsuffizienz (65).

Zu äußerst ungewöhnlichen unerwünschten Begleiterscheinungen, die sich bei weit weniger als 1 % der behandelten Patienten/-innen abzeichnen, zählen kardiale Erkrankungen, wie Myokarditis, Kardiomyopathien, Arrhythmien, neurologische Beschwerden wie Autoimmunenzephalitis, aseptische Meningitis, Myasthenie Gravis oder sarkoidose ähnliche granulomatöse Reaktionen, Nebenniereninsuffizienz und Diabetes mellitus (65).

### 1.6.3 Prognose

Die Immuntherapie mit PD-1-Inhibitoren zeigt nachweislich eine Verlängerung des Gesamtüberlebens der Patienten/-innen und ein Aufhalten der Tumorprogression (66). Allerdings ist auch eine starke Heterogenität beim Ansprechen der Tumorzellen auf die Behandlungsmethode erkennbar. So hat ein Anteil der oralen Plattenepithelkarzinome weiterhin einen progredienten Verlauf und weist keine positive Reaktion auf das Heilverfahren auf (40).

Bei 8 – 29 % der Patienten/-innen, welche mit einer Immuntherapie behandelt wurden, tritt eine Hyperprogression des Karzinoms auf, welche sich durch ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum, eine Beschleunigung der Erkrankung und einen deutlich verschlechterten klinischen Zustand äußert (67) (68). Allerdings ist noch nicht hinreichend geklärt, welche Faktoren diese rasche Krankheitsprogression begünstigen und auslösen. In einzelnen Studien gibt es Hinweise darauf, dass das Alter der Patienten/-innen eine Rolle spielt und eine Hyperprogression bei Patienten/-innen über 65 Jahren signifikant häufiger auftritt (67). Des Weiteren wird ein beschleunigter Krankheitsverlauf bei Erkrankten mit mehr als zwei Metastasen in Zusammenhang gebracht (67). Daneben stellen genomische Veränderungen einen wesentlichen Aspekt dar (67). Dabei wird das MDM2-Onkogen erwähnt, welches den Tumorsuppressor p53 durch eine Hemmung der Aktivität und eine Reduktion der Proteinstabilität negativ reguliert (69). Bei verstärktem Auftreten dieses Regulators MDM2, konnte mehrfach eine Hyperprogression des Karzinoms beobachtet werden (68). Über dies hinaus ist eine Aberration und Überexpression des EGF-Rezeptors von Bedeutung, welche die Progressionsgeschwindigkeit des Tumors im Vergleich zum Zustand vor Beginn der Therapie um bis zu 42-fach steigern kann (68). In ungefähr 10 % der Fällen bei welchen zuerst durch bildgebende Verfahren eine Hyperprogression diagnostiziert wurde, stellt sich nach einiger Zeit wider Erwarten ein Behandlungserfolg ein (67). Dabei zeigen sich eine zunehmende Verkleinerung des Tumorgewebes und eine klinische Besserung. Dieses Phänomen wird als Pseudohyperprogression bezeichnet (68).

Auffallend ist die Tatsache, dass es vor allem vielversprechende Ergebnisse bei fortgeschrittenen rezidivierten oder metastasierten Kopf- und Halstumoren gibt (17). Es scheint, dass die Immuntherapie besser bei HPV positiven und damit p16 positiven Krebszellen anspricht als bei HPV negativen (17) (64). Des Weiteren gelten

auch eine PD-L1-Expression größer 1 % und eine hohe Mutationsbelastung der veränderten Zellen als Beschaffenheit für eine wirkungsvollere Immuntherapie (66) (40). Dagegen kommen aber auch PD-L1 negative Karzinome vor, welche bei PD-1-Blockade trotzdem eine regrediente Entwicklung des Tumors aufweisen (17). Zudem wird die histochemische Beurteilung des PD-L1 Status von Faktoren wie der Biopsiezeit, beispielsweise direkt vor oder nach einer Bestrahlung, oder der Lokalisation der relevanten Immunschnittstelle beeinflusst und verfälscht (45). Daraus resultiert, dass bisher kein signifikanter Biomarker gefunden werden konnte und sich damit eine genaue Prädiktion des Behandlungsergebnisses schwierig gestaltet (64).

Weiterhin zeigt sich eine Verbesserung der Anti-Tumor-Reaktion bei einer Kombination einer Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs und einer Radiatio. Die Bestrahlung bewirkt einerseits eine direkte Läsion der Krebszell-DNA und führt durch Einzel- und Doppelstrangbrüche zu Apoptosen und Nekrosen der entarteten Zellen. Andererseits induziert dies wiederum eine Freisetzung von Gefahrensignalen wie Calreticulin, High-mobility-group-Protein B1, Adenosintriphosphat und Hitzeschockproteinen, welche ein immunstimulierendes Tumormikromilieu bilden. Dieser Effekt spielt eine wesentliche Rolle bei der Auslösung einer Anti-Tumor-Immunreaktion (70).

## **1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Da auch bei einer Kombination der Immuncheckpoint-Blockade und Strahlen- oder Chemotherapie das Ansprechen qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlich ausfällt, stellt sich die Frage, worin dies begründet ist (70). Ein möglicher Aspekt könnte die Veränderung der Lokalisation von PD-L1 nach der Bestrahlung sein und damit verbunden eine erschwerte Interaktion der PD-1-Inhibitoren mit PD-L1. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob PD-L1 intrinsische Funktionen hat, welche einen Selektionsvorteil bieten können. Ziel dieser Arbeit war es die Lokalisation von PD-L1 sowohl auf der Membran der Plattenepithelkarzinomzellen, als auch in anderen Bestandteilen wie der Zytoskelett- und Kernfraktion nachzuweisen. Dies wurde zum einen vor als auch nach einer Radiatio mit einer Gesamtdosis von 8 Gy getestet, um zu ermitteln, ob ionisierende Strahlung eine Veränderung der PD-L1-Expression in bestimmten Bereichen der Zelle beeinflusst.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

Die Versuche wurden mit sechs verschiedenen Tumorzelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich (HNSCC) durchgeführt. Die Karzinome wurden ursprünglich, unter Leitung von Frau Prof. Dr. Theresa L. Whiteside am Cancer Institute der University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA, aus verschiedenen Patienten von unterschiedlichen oralen Bereichen entnommen und im Labor kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien wurden zuletzt im Juni 2018 anhand von STR-DNA-Typisierung vom Leibniz-Institut überprüft. Sowohl die Lokalisation und die TNM-Klassifikation der entsprechenden Zelllinien, als auch das Alter und Geschlecht der Patienten werden in Tabelle 1 dargestellt. (71) (72)

**Tabelle 1: Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien**

| <b>Zelllinie</b> | <b>Lokalisation</b>            | <b>pTNM</b> | <b>Geschlecht</b> | <b>Alter</b> |
|------------------|--------------------------------|-------------|-------------------|--------------|
| PCI 1            | Larynx                         | T2N0M0      | männlich          | 65           |
| PCI 8            | Sinus piriformis (Hypopharynx) | T3N0M0      | männlich          | 54           |
| PCI 9            | Zugengrund                     | T4N3M0      | männlich          | 56           |
| PCI 13           | Retromolares Dreieck           | T4N1M0      | männlich          | 50           |
| PCI 15           | Sinus piriformis (Hypopharynx) | T2N1M0      | männlich          | 69           |
| PCI 52           | Plica aryepiglottica           | T1N2M0      | männlich          | n.a.         |

### 2.2 Kulturmedium

Die verwendeten HNSCC Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 1,0 g/L Glucose (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) kultiviert. Dieses Kulturmedium wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum (FBS)) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) angereichert.

## 2.3 Kit

**Tabelle 2: Verwendete Kits**

| Kit   | Verwendung         | Hersteller, Ort                       |
|---|--------------------|---------------------------------------|
| ProteoExtract®<br>Subcellular Proteome Extraction Kit | Zellfraktionierung | Merck Chemicals<br>GmbH, Darmstadt, D |

## 2.4 Reagenzien und Lösungen

**Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Lösungen**

| Reagenz/Lösung                            | Hersteller                   | Ort                  |
|---|------------------------------|----------------------|
| 3,3'-Diamino-benzidine (DAB) Tablets      | Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH | München, D           |
| 40 % Acrylamide/Bis Solution, 29:1        | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH | München, D           |
| Accutase                                  | Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH | München, D           |
| Aceton                                    | Merck Chemicals<br>GmbH      | Darmstadt, D         |
| Albumin Standard                          | Thermo Scientific            | Rockford, IL,<br>USA |
| Ammoniumpersulfat (APS)                   | Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH | Taufkirchen, D       |
| ATX Ponceau S red staining solution       | Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH | Taufkirchen, D       |
| BCA Solution                              | Merck Chemicals<br>GmbH      | Darmstadt, D         |
| Bovine Serum Albumin (BSA,<br>Fraction V) | BIOMOL GmbH                  | Hamburg, D           |
| Bromphenolblau                            | Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH | Taufkirchen, D       |
| Control Vector (CV) pcDNA 3.1 (+)         | Thermo Fisher<br>Scientific  | Bonn, D              |

|   |                            |                      |
|---|----------------------------|----------------------|
| DMEM 1,0 g/l Glucose  | PAN-Biotech GmbH           | Aidenbach, D         |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Calciumchlorid, ohne Magnesiumchlorid, 1x | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  | Taufkirchen, D       |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + Calciumchlorid + Magnesiumchlorid, 10x       | Life Technologies GmbH     | Darmstadt, D         |
| Envision™+Dual Link-System-HRP  | DAKO, Agilent Technologies | Carpinteria, CA, USA |
| Eosin   | Carl Roth GmbH             | Karlsruhe, D         |
| Ethanol   | Merck Chemicals GmbH       | Darmstadt, D         |
| Fetal Bovine Serum (FBS)  | Life Technologies GmbH     | Carlsbad, CA, USA    |
| FuGENE HD Transfection Reagent  | Promega Corporation        | Fitchburg, WI, USA   |
| Glycerol 87 %   | Applichem GmbH             | Darmstadt, D         |
| Glycin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  | Taufkirchen, D       |
| H <sub>2</sub> O DNase und RNasefrei, sterilfiltriert                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  | Taufkirchen, D       |
| Hämalaun  | Carl Roth GmbH             | Karlsruhe, D         |
| Interferon $\gamma$   | Peptotech                  | Hamburg, D           |
| Isopropanol   | Merck Chemicals GmbH       | Darmstadt, D         |
| Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> ) 4 %   | Merck Chemicals GmbH       | Darmstadt, D         |
| L-Glutamin 200 mM   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  | München, D           |
| Methanol (MeOH)   | Carl Roth GmbH & Co.KG     | Karlsruhe, D         |
| Milchpulver Blotting Grade  | Carl Roth GmbH & Co.KG     | Karlsruhe, D         |

|  |                           |                    |
|--|---------------------------|--------------------|
| Mounting Medium for Fluorescence with DAPI   | Vector Laboratories Inc.  | Burlingame, USA    |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |
| NanoLink Steptavidin Magnetic Beads  | TriLink Biotechnologies   | San Diego, CA, USA |
| Natriumchlorid (NaCl)  | VWR International GmbH    | Ismaning, D        |
| Nonidet P40 Substitute   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | St. Louis, USA     |
| Normal Goat Serum, NGS   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | St. Louis, MO, USA |
| Paraformaldehyd (PFS)  | Merck Chemicals GmbH      | Darmstadt, D       |
| PD-L1 pcDNA 3.1 (+)  | Thermo Fisher Scientific  | Bonn, D            |
| Penicillin/Streptomycin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | München, D         |
| Pierce Premium-Grade-Sulfo-NHS-SS-Biotin   | Thermo Scientific         | Rockford, USA      |
| Precision Plus Dual Color Protein Standards Größenmarker                                 | Bio-Rad Laboratories GmbH | München, D         |
| Proteaseinhibitor cOmplete mini Tablets  | Roche Diagnostics GmbH    | Mannheim, D        |
| Proteaseinhibitor cOmplete mini, EDTA-free   | Roche Diagnostics GmbH    | Mannheim, D        |
| ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution   | Merck Chemicals GmbH      | Darmstadt, D       |
| RIPA Buffer  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |
| ROTI ® CALIPURE Pufferlösung pH 4,00 und pH 7,00 (Kalibrierflüssigkeit für pH-Messgerät) | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe, D       |

|   |                           |                    |
|---|---------------------------|--------------------|
| Roti®-Lumin   | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe, D       |
| Salzsäure rauchend, 37 % (HCl)                        | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe, D       |
| Sodium Hydroxide Solution 1M                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | St. Louis, MO, USA |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS)                             | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe, D       |
| SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Scientific         | Bonn, D            |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)                | Merck Chemicals GmbH      | Darmstadt, D       |
| Tris-Hydrochlorid                                     | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe, D       |
| Triton X-100  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |
| Trypsin-EDTA, 10x                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |
| TWEEN® 20   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |
| Vitro-Clude®  | R. Langenbrinck GmbH      | Emmendingen, D     |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, D       |
| Xylol   | Carl Roth GmbH & Co.KG    | Karlsruhe          |
| β- Mercaptoethanol                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Taufkirchen, D     |



## 2.5 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Verwendete Materialien**

| <b>Material</b>   | <b>Hersteller</b>             | <b>Ort</b>           |
|---|-------------------------------|----------------------|
| 1,5 ml Eppendorf Tube   | Eppendorf AG                  | Hamburg, D           |
| Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K                                 | Merck Chemicals GmbH          | Darmstadt, D         |
| Cellstar® Platten, flat bottom, transparent mit Deckel: 6, 96 Wells | Greiner Bio-One GmbH          | Kremsmünster, A      |
| Combitips advanced®, 5 ml   | Eppendorf AG                  | Hamburg, D           |
| Corning™ CentriStar™ Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml               | Corning Inc.                  | Corning, USA         |
| Cryoröhrchen, Rundboden, 2 ml                                       | VWR International GmbH        | Ismaning, D          |
| Falcon® 4-Well Culture Slide  | BD Biosciences                | Bedford, MA, USA     |
| Filterpipettenspitzen (1, 5, 10, 100, 1000 µl)                      | Kisker Biotech GmbH & Co.KG   | Steinfurt, D         |
| Flaschenverschlussfilter, Porengröße 0,22 µm                        | Corning Inc.                  | Corning, USA         |
| Gel-Blotting Papier, 0,34 mm; 580 x 680 mm                          | Carl Roth GmbH & Co.KG        | Karlsruhe, D         |
| High Precision Deckgläser   | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG | Lauda-Königshofen, D |
| Kulturflaschen T25, T75   | Corning Inc.                  | Corning, USA         |
| Parafilm M  | Bemis Company Inc.            | Neenah, WI, USA      |
| Pipettenspitzen 20, 100, 1000 µl                                    | Greiner Bio-One GmbH          | Kremsmünster, A      |
| Prospekthüllen, glasklar A4   | InterES GmbH                  | Nürnberg, D          |
| PVDF Western Blotting Membrane                                      | Roche Diagnostics GmbH        | Mannheim, D          |
| Serologische Pipetten 2 ml  | Corning Inc.                  | Corning, USA         |

|  |                        |              |
|--|------------------------|--------------|
| Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml    | Sarstedt AG &Co        | Nümbrecht, D |
| Zählkammer Cedex Smart<br>Slides 1 x 8 Tests | Roche Diagnostics GmbH | Mannheim, D  |

## 2.6 Geräte

**Tabelle 5: Verwendete Geräte**

| Gerät  | Hersteller   | Ort               |
|--|--|-------------------|
| 6-MV-Linearbeschleuniger,<br>Photonenstrahl (3 Gy/min)                                 | Primus, Siemens, Clin<br>Oral Invest                     | Nürnberg, D       |
| Brutschrank HERAccl 240  | Thermo Scientific  | Rockford, IL, USA |
| Elektrophoresekammer und<br>Blotapparatur Mini-PROTEAN®<br>Tetra System                | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH                             | München, D        |
| Eppendorf Research R plus,<br>Einkanalpipette, variable 0,5-10,<br>10-100, 100-1000 µl | Eppendorf AG, Bio-Rad<br>Laboratories GmbH               | Hamburg, D        |
| GENios Plattenphotometer   | Tecan Group Ltd.   | Männedorf, CH     |
| Glasplatten für SDS-PAGE<br>Mini-PROTEAN® Glass plates<br>für 1,5 mm Gele              | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH                             | München, D        |
| HLC Heizblock BT 130-2   | DITABIS AG - Digital<br>Biomedical Imaging<br>Systems AG | Pforzheim, D      |
| IKA Magnetruhrer RCT Basic   | IKA®-Werke GmbH &<br>Co. KG                              | Staufen, D        |
| Laborschüttelgerät BlotBoy™  | Benchmark Scientific<br>Inc.                             | Edison, NJ, USA   |
| Licht und Fluoreszenzmikroskop<br>Eclipse<br>TE2000-U                                  | Nikon Instruments<br>Europe BV                           | Amsterdam, NL     |
| Lichtmikroskop CKX41   | Olympus Corporation                                      | Tokyo, J          |

|  |                                     |                       |
|--|-------------------------------------|-----------------------|
| Magnetständer                                  | Merck Chemicals GmbH                | Darmstadt, D          |
| Mini-PROTEAN® Gel releaser                     | Bio-Rad Laboratories GmbH           | München, D            |
| Mini-PROTEAN® Kamm für 15 Taschen, 1,5 mm Gele | Bio-Rad Laboratories GmbH           | München, D            |
| Minizentrifuge Sprout TM                       | Heathrow Scientific                 | Vernon Hills, IL, USA |
| Multipette® plus                               | Eppendorf AG                        | Hamburg, D            |
| Netzgerät PowerPac™ Basic                      | Bio-Rad Laboratories GmbH           | München, D            |
| Nikon Digital Sight DS-U1                      | Nikon Instruments Europe BV         | Amsterdam, NL         |
| pH 211 Microprocessor pH Meter                 | Hanna Instruments Deutschland GmbH  | Vöhringen, D          |
| PipetusR-akku                                  | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG | Eberstadt, D          |
| Präzisionswaage Talent TE2101                  | Sartorius AG                        | Göttingen, D          |
| Rotator  | Carl Roth GmbH & Co.KG              | Karlsruhe, D          |
| Schüttelwasserbad 1086                         | Gesellschaft für Labortechnik mbH   | Burgwedel, D          |
| Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe®         | Kendro Laboratory Products GmbH     | Langenselbold, D      |
| Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls             | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG   | Berlin, D             |
| Vortex Genie2                                  | Scientific Industries               | New York, NY, USA     |
| Wippschüttler Typ MR-1 Mini Rocker             | BioSan                              | Riga, LV              |
| Zellzählgerät Cedex XS Analyzer                | Roche Diagnostics GmbH              | Mannheim, D           |
| Zentrifuge 3K-30                               | Sigma-Laborzentrifugen              | Osterode am Harz, D   |

|  |                                    |                  |
|--|------------------------------------|------------------|
| Zentrifuge Heraeus® Multifuge®<br>3S-R | Kendro Laboratory<br>Products GmbH | Langenselbold, D |
| Zentrifuge PerfectSpin 24 Plus         | Peqlab Biotechnologie<br>GmbH      | Erlangen, D      |
| Zentrifuge Rotanta 460                 | Andreas Hettich GmbH<br>& Co.KG    | Tuttlingen, D    |

## 2.7 Puffer und Lösungen

### 2.7.1 Zellkultur

**Tabelle 6: Trypsin-EDTA, 1x, 50 ml**

| Komponente       | Menge |
|------------------|-------|
| Trypsin-EDTA 10x | 5 ml  |
| PBS              | 45 ml |

### 2.7.2 Sulfo-NHS-SS-Biotin

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Lysepuffers, 10 ml**

| Komponenten  | Menge      |
|--|------------|
| 25 mM Tris pH 7,6  | 2,5 ml     |
| 150 mM NaCl  | 150 µl     |
| 0,1 % SDS  | 10 µl      |
| 0,5 % Nonidet P40  | 50 µl      |
| Entionisiertes H <sub>2</sub> O                          | 7,29 ml    |
| Proteaseinhibitor<br>cOmplete mini<br>Tablets, EDTA free | 1 Tablette |

Für die Stocklösung wurden Tris (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland), NaCl (VWR International, Ismaning, Deutschland), SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Nonidet P40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA) und bidestilliertes Wasser (Sigma-Aldrich) gemischt und 1 Protease Inhibitor Tablette

(Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) darin gelöst. Die Reagenzien wurden bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

### 2.7.3 Western Blot

#### 2.7.3.1 Proteinisolierung und –konzentrationsbestimmung

**Tabelle 8: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers, 10 ml**

| Komponente                                    | Menge      |
|---|------------|
| RIPA Buffer                                   | 10 ml      |
| Proteaseinhibitor<br>cOmplete mini<br>Tablets | 1 Tablette |

Die Proteaseinhibitor Tablette (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wird in 10 Milliliter (ml) RIPA Buffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) aufgelöst und aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des BCA-Reagenzes**

| Komponente                            | Menge    |
|---------------------------------------|----------|
| BCA Solution                          | 49 Teile |
| CuSO <sub>4</sub> , 4 %<br>(Substrat) | 1 Teil   |

### 2.7.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers, 5x**

| Komponente               | Menge |
|--------------------------|-------|
| 1,5 M Tris pH 6,8        | 4 ml  |
| Glycerol                 | 10 ml |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 5 ml  |
| SDS                      | 2 g   |
| Bromphenolblau<br>1 %    | 1 ml  |

**Tabelle 11: Zusammensetzung des 10%igen Acrylamid-Trenngels, 1,5 mm dick**

| Komponente                      | Menge        |
|---------------------------------|--------------|
| Entionisiertes H <sub>2</sub> O | 2,7 ml       |
| Acrylamid, 40 %                 | 1,87 ml      |
| 20 % SDS                        | 37,5 $\mu$ l |
| 1 M Tris pH 8,8                 | 2,82 ml      |
| 10 % APS                        | 37,5 $\mu$ l |
| TEMED                           | 7,5 $\mu$ l  |

**Tabelle 12: Zusammensetzung des 4%igen Acrylamid-Sammelgels, 1,5 mm dick**

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

Für die Gelelektrophorese wurde ein zweischichtiges Gel bestehend aus einem Sammelgel mit 4 % Polyacrylamid und einem Trenngel mit einem Anteil von 10 % Polyacrylamid hergestellt. Das Sammelgel konzentriert die Proteine in einer Ebene

und sorgt damit für schärfere Banden und die Möglichkeit größere Probenvolumina zu pipettieren. Das darauffolgende Trenngel separiert die Proteine und trennt sie nach ihrer atomaren Masse und Größe auf. Hierfür wurden zunächst zwei Glasplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) für das Gießen der Polyacrylamidgele mit Wasser gereinigt und daraufhin in die vorbereitete Station eingespannt. Anschließend wurde zuerst das Trenngel eingefüllt und mit Isopropanol (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) beschichtet, um einen glatten Rand zu erhalten und ein Austrocknen der Oberfläche zu verhindern. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war, wurde das Isopropanol (Merck Chemicals) dekantiert und das Sammelgel zwischen die Glasplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingefüllt. Zum Schluss wurde ein Kamm mit 15 Taschen (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in das Sammelgel eingesetzt und die Polymerisation abgewartet.

**Tabelle 13: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Elektrodenpuffers, 10x**

| <b>Komponente</b> | <b>Menge</b> |
|-------------------|--------------|
| Tris pH 8,5       | 250 mM       |
| Glycin            | 1,92 M       |
| SDS               | 1 %          |

**Tabelle 14: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Elektrodenpuffers, 1x, 1 L**

| <b>Komponente</b>                | <b>Menge</b> |
|----------------------------------|--------------|
| SDS-PAGE-Elektrodenpuffer        | 100 ml       |
| Bidestilliertes H <sub>2</sub> O | 900 ml       |

**Tabelle 15: Zusammensetzung des Blotpuffers, 10x**

| <b>Komponente</b> | <b>Menge</b> |
|-------------------|--------------|
| Tris pH 8,5       | 250 mM       |
| Glycin            | 1,92 M       |

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Blotpuffers, 1x, 1 L**

| Komponente                       | Menge  |
|----------------------------------|--------|
| Blotpuffer, 10x                  | 100 ml |
| MeOH                             | 100 ml |
| Bidestilliertes H <sub>2</sub> O | 800 ml |

**Tabelle 17: Zusammensetzung TBS, 10x, pH 7,5**

| Komponente                       | Menge      |
|----------------------------------|------------|
| Tris                             | 200 mM     |
| NaCl                             | 1,5 M      |
| Konzentrierte HCl                | Bis pH 7,5 |
| Bidestilliertes H <sub>2</sub> O | ad 1 L     |

Tris (Merck Chemicals) und NaCl (VWR International) wurden unter Rühren in bidestilliertem Wasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelöst und mit Salzsäure rauchend 37 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) auf pH-Wert 7,5 eingestellt.

**Tabelle 18: Zusammensetzung TBST, 1x, 1 L**

| Komponente                       | Menge  |
|----------------------------------|--------|
| TBS, 10x                         | 100 ml |
| TWEEN® 20                        | 1 ml   |
| Bidestilliertes H <sub>2</sub> O | Ad 1 L |

### 2.7.3.3 Primärantikörper

**Tabelle 19: Verwendete Primärantikörper zum Nachweis von PD-L1, Lamin A/C, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, GAPDH, PD-L1, β-Aktin und β-Tubulin**

| Antikörper                           | Hersteller, Ort         | Host   | Art des AK | Verwendung  |
|--------------------------------------|-------------------------|--------|------------|---|
| GAPDH<br>ab9385<br>HRP<br>Konjugiert | Abcam, Cambridge,<br>UK | Rabbit | Polyklonal | Extraktion<br>Kit WB<br>Zytoplasmafraktion,<br>Sulfo-NHS-WB<br>Kontrolle der Reinheit |



|   |  |        |            |   |
|---|--|--------|------------|---|
| IgG Isotyp-kontrolle I5006                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, MO, USA        | Rabbit | Polyklonal | DAB-Färbung   |
| Lamin A/C #2032                               | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D | Rabbit | Polyklonal | ExtraktionKit WB Kernfraktion                                       |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase #3010 | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D | Rabbit | Polyklonal | Kontrolle Sulfo-NHS-WB, ExtraktionKit WB Membranfraktion            |
| PD-L1 #13684 (E1L3N)                          | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D | Rabbit | Monoklonal | DAB-Färbung, Sulfo-NHS-WB, ExtraktionKit WB                         |
| β-Aktin ab8227                                | Abcam, Cambridge, UK                                 | Rabbit | Polyklonal | Ladekontrolle bei WB mit IFN γ, Sulfo-NHS-WB Kontrolle der Reinheit |
| β-Tubulin #2128                               | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D | Rabbit | Monoklonal | ExtraktionKit WB Zytoskelettfraktion                                |

### 2.7.3.4 Sekundärantikörper

**Tabelle 20: Verwendete HRP-konjugierte Sekundärantikörper**

| Antikörper  | Hersteller                                      | Host  | Reaktiv gegen |
|---|---|-------|---------------|
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody #32460, HRP konjugiert  | Thermo Fisher Scientific, Bonn, D               | Goat  | Rabbit        |
| Rabbit TrueBlot® Anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert, clone eB182 (spz. für Immunpräzipitation mit magnetischen Kugeln) | Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, PA, USA | Mouse | Rabbit        |

## 2.7.4 Histologie

**Tabelle 21: Fixierlösung, 4 % PFA**

| Komponente            | Menge     |
|-----------------------|-----------|
| Paraformaldehyd (PFA) | 4 g       |
| PBS                   | Ad 100 ml |

Die Fixierlösung wird bei -20 °C aliquotiert aufbewahrt.

## 2.8 Software

**Tabelle 22: Verwendete Programme**

| Programm                              | Hersteller                       | Ort                  | Verwendung  |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------|---|
| Cedex XS<br>Software Version<br>1.0.4 | Roche Diagnostics<br>GmbH        | Mannheim, D          | Zellzellbestimmung  |
| ChemiDoc XRS+<br>Imaging System       | BioRad                           | Hercules, CA,<br>USA | Dokumentation<br>Chemilumineszenz<br>und Kolorimetrie<br>(Western Blot) |
| GraphPad Prism<br>6                   | GraphPad<br>Software, Inc.       | La Jolla, CA, USA    | Graphische<br>Darstellung, Statistik                                    |
| Image J Version<br>1.8.0              | National Institutes<br>of Health | Bethesda, MD,<br>USA | Bildbearbeitung   |
| Image Lab<br>Software 5.2.1           | BioRad                           | Hercules, CA,<br>USA | Bildbearbeitung   |
| Magellan6                             | Tecan Group Ltd.                 | Männedorf, CH        | Photometrische<br>Messung (BCA<br>Proteinbestimmung)                    |
| NIS-Elements AR<br>3.2                | Nikon Instruments<br>Europe BV   | Amsterdam, NL        | Kamerasteuerung für<br>Nikon Digital Sight<br>DS-U1                     |

## **3. Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 2D-Zellkultur**

Die adhärenenten HNSCC Zelllinien wurden in T75-Zellkulturflaschen (Corning Inc., Corning, USA) kultiviert. Das Zellkulturmedium dabei war ein Medium auf Basis von DMEM mit 1 g/L Glucose (PAN-Biotech), angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS) (Life Technologies), 1 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich). Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden die Zellkulturflaschen im Inkubator (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt und nach Erreichen der gewünschten Konfluenz passagiert. Bei einer maximalen Konfluenz von 80 % oder spätestens alle drei Tage wurde das Kulturmedium erneuert, um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten und die Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte zu minimieren. Dazu wurde zuerst das frische Kulturmedium auf 37 °C erwärmt. Daraufhin wurde das Medium in den Kulturflaschen (Corning Inc.) abgesaugt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gewaschen und mit einer geringen Menge 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) überschichtet. Bis zum Ablösen wurden die Zellen für circa 5 - 10 Min im Brutschrank (Thermo Scientific) inkubiert. Da die im fötalen Kälberserum enthaltenen Proteinaseinhibitoren die Trypsinierungsreaktion stoppen, wurden die Zellen, sobald sie sich vom Zellkulturflaschenboden (Corning Inc.) gelöst hatten, in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl wurde in neue T75-Zellkulturflaschen (Corning Inc.) überführt und inkubiert (Thermo Scientific).

#### **3.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die adhärenenten Zellen von der Zellkulturflasche (Corning Inc.) gelöst und in Kulturmedium auf eine Konzentration zwischen  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml gebracht. 25 Mikroliter (µl) der Zellsuspension wurden entnommen und unverdünnt für eine automatische Zellzählung in eine Zählkammer des Smart Slides (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

überführt. Das Smart Slide (Roche Diagnostics) wurde daraufhin in das Zellzahlgerät Cedex XS (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) eingelegt, mit den Einstellungen 1:1 VD und Standard Size des Programmes Cedex XS Software Version 1.0.4 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ausgewertet und die Zellzahl pro ml ermittelt. Die Einstellung „Std Size“ war dabei auf die Größe der verwendeten Zellen abgestimmt, wodurch kleinere und größere Partikel bei der Zählung ausgeschlossen wurden, um eine sehr genaue Zellzahl erfassen zu können.

### **3.2 Bestrahlung der Kopf- und Halstumorzellen**

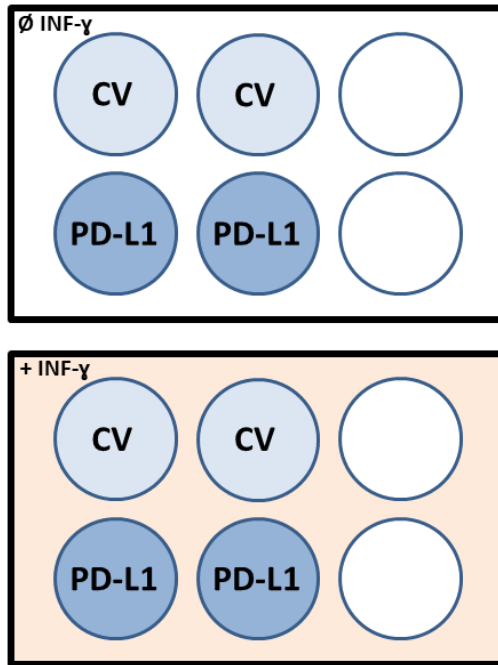
Die Bestrahlung der Zellen erfolgte durch den Linearbeschleuniger der Strahlentherapie der Universitätsklinik Regensburg, unter der Leitung von Oberarzt PD Dr. Matthias Hautmann. Die Zellen wurden frühestens 24 Stunden (Std) nach der Aussaat bestrahlt. Dazu wurden sie für die Radiatio auf einer Behandlungsliege platziert. Ober- und unterhalb der Zellkulturflaschen (Corning Inc.) oder Objektträger (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) wurden 2 cm dicke Plexiglasscheiben positioniert, um den Dosisaufbaueffekt reeller zu gestalten. Danach wurden sie durch einen 6-MV-Linearbeschleuniger (Siemens, Clin Oral Invest, Nürnberg, Deutschland) mit einem Photonenstrahl mit 3 Gy pro Min und einer Gesamtdosis von 8 Gy bei Raumtemperatur (RT) bestrahlt. Die unbestrahlten Zellen dienten der Kontrolle und wurden demselben Transport unterzogen, um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Das Kulturmedium wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung abgesaugt und durch Frisches ersetzt.

### **3.3 Transiente Transfektion von Plasmid DNA**

#### **3.3.1 Transiente PD-L1 Überexpression in PCI 9**

Für das Experiment wurde der Versuchsansatz bei einer Hälfte der Zellen mit IFN  $\gamma$ -haltigem (Peprotech, Hamburg, Deutschland) Kulturmedium, bei dem anderen Teil mit normalem Kulturmedium durchgeführt. Dazu wurde zu Beginn ein Kulturmedium mit einer IFN  $\gamma$ -Konzentration (Peprotech) von 15 Nanogramm/Milliliter (ng/ml) hergestellt und 6-Well-Platten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) nach der in Abbildung 2 dargestellten Übersicht

beschriftet. Die Zellen der Zelllinie 9 wurden daraufhin mittels 1x Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) vom Zellkulturflaschenboden (Corning Inc.) gelöst und die Zellen einer T75-Kulturflasche (Corning Inc.) in normalem serumhaltigem Kulturmedium, die PCI 9 einer zweiten Zellflasche (Corning Inc.) in IFN  $\gamma$  (Peprotech)-haltigem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden von jeder Zellsuspension die Zellzahl pro Milliliter mithilfe des Zellzahlgeräts Cedex XS (Roche Diagnostics) bestimmt und pro Well 200.000 Zellen ausgesät. Die 6-Well-Platten (Greiner Bio-One) wurden für 4 Std im Brutschrank (Thermo Scientific) inkubiert und die Adhäsion der Zellen abgewartet. Währenddessen wurden zwei serumfreie Medien (PAN-Biotech) ohne Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich) und L-Glutamin (Sigma-Aldrich) vorbereitet, wobei das Zweite mit einer IFN  $\gamma$  (Peprotech)-Konzentration von 15 ng/ml hergestellt wurde. Hierbei wurde serumfreies Medium verwendet, damit die Zellen bei der anschließenden Transfektion nicht durch Serumproteine oder Antibiotika, die hierbei ins Innere der Zellen gelangen können, geschädigt werden. Des Weiteren wurden die Transfektionsreagenzien angesetzt. Hierzu wurden das FuGENE HD Reagent (Promega Corporation, Fitchburg, USA), das PD-L1 Plasmid (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) und der Kontrollvektor (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) auf RT gebracht und vor dem Pipettieren gut gevortext (Scientific Industries, New York, USA). Danach wurden nacheinander das serumfreie Medium (PAN-Biotech) ohne IFN  $\gamma$  (Peprotech), die Plasmid DNA und danach die FuGENE Reagenz (Promega Corporation) in ein 1,5 ml Eppendorf tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben, kurz gemischt und für 10 bis maximal 15 Min bei RT inkubiert. Das Verhältnis zwischen der FuGENE Reagenz (Promega Corporation) und der jeweiligen Plasmid DNA betrug 5  $\mu$ l : 2  $\mu$ g und die Menge der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 22 und 23 aufgeführt. Nachdem die 4 Std Adhäsionszeit vorüber waren, wurde das Kulturmedium aus den einzelnen Wells abgesaugt, die Zellen mit 2 ml 1 x PBS (Sigma-Aldrich) pro Well gewaschen und 2 ml des neuen serumfreien Mediums (PAN-Biotech) entsprechend der Beschriftung mit oder ohne IFN  $\gamma$  (Peprotech) in jedes Well gegeben. Dazu wurden jeweils pro Well 100  $\mu$ l des Transfektionsmix mit dem PD-L1-Plasmid (Thermo Fisher Scientific) oder dem Kontrollvektor (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und die Zellen (Greiner Bio-One) für 24 Std im Inkubator (Thermo Scientific) transfiziert.



**Abbildung 2: Beschriftung der 6-Well-Platte bei der PD-L1 Überexpression**

CV = Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden;

PD-L1 = Zellen, die mit einem Vektor mit der kodierenden Gensequenz für PD-L1 transfiziert wurden;

Ø IFN- $\gamma$  = Medium ohne IFN  $\gamma$ ;

+ IFN- $\gamma$  = Medium mit IFN  $\gamma$ ;

**Tabelle 23: Zusammensetzung des PD-L1-Plasmid-Tranfektionsmixes, Volumen pro Well**

| Komponente          | Menge                   |
|---------------------|-------------------------|
| Serumfreies Medium  | 93 $\mu$ l              |
| PD-L1 pcDNA 3.1 (+) | 2 $\mu$ l (= 2 $\mu$ g) |
| FuGENE Reagenz      | 5 $\mu$ l               |
| Gesamt              | 100 $\mu$ l             |

**Tabelle 24: Zusammensetzung des Kontrollvektor-Transfektionsmixes, Volumen pro Well**

| Komponente                        | Menge                   |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Serumfreies Medium                | 94 $\mu$ l              |
| Control Vector (CV) pcDNA 3.1 (+) | 1 $\mu$ l (= 2 $\mu$ g) |
| FuGENE Reagenz                    | 5 $\mu$ l               |
| Gesamt                            | 100 $\mu$ l             |

### 3.3.2 Aussaat transfizierter Zellen und Bestrahlung

Um die Zellen bestrahlen und PD-L1 mittels DAB-Färbung kennzeichnen zu können, wurden die transfizierten PCI 9 in Objektträger ausgesät. Dazu wurden zuerst 4-kammrige Objektträger (BD Biosciences) gekennzeichnet, in welche die transfizierten PCI 9 übergesiedelt werden sollten. (vgl. Abb. 3) Dazu wurden die 6-Well-Platten (Greiner Bio-One) aus dem Brutschrank (Thermo Scientific) genommen, das serumhaltige Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml 1 x PBS (Sigma-Aldrich) pro Well gewaschen und mit 300  $\mu$ l Trypsin (Sigma-Aldrich) pro Well überschichtet. Danach wurden die Platten (Greiner Bio-One) für 5 - 10 Min inkubiert bis alle Zellen vom Boden gelöst waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Kulturmedium passend der Beschriftung mit oder ohne IFN  $\gamma$  (Peprotech) gestoppt. Die PCI 9 wurden resuspendiert und die Zellzahl pro Milliliter, wie in Punkt 3.1.2 beschrieben, bestimmt. Da der Bestrahlungszeitpunkt 24 Std später datiert war und eine Konfluenz von 60-70 % zum Fixierungszeitpunkt erzielt werden sollte, wurden die Zellzahlen, wie in Tabelle 24 ausgeführt, dementsprechend gewählt. Die transfizierten PCI 9 wurden in richtiger Anzahl in die Objektträger (BD Biosciences) umgesiedelt und das Volumen durch Kulturmedium mit oder ohne IFN  $\gamma$  (Peprotech) pro Kammer auf 1 ml ergänzt. Daraufhin wurden die Objektträger (BD Biosciences) 24 Std inkubiert und danach ein Teil davon durch einen 6-MV-Linearbeschleuniger (Siemens, Clin Oral Invest), wie in Punkt 3.2 beschrieben, bestrahlt. Im Anschluss nach der Radiatio wurden die Zellen zum 4 Std und 72 Std Zeitpunkt nach der Strahlentherapie fixiert. (vgl. Abb. 4)

|                       | Keine Bestrahlung   | Bestrahlung 8 Gy      |                       |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
|-----------------------|---|-----------------------|-----------------------|---------|-------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----|----|-------|-------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|----|----|-------|-------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----|----|-------|-------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 4h ZP                 | <table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">ISO</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table><br><table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">+<br/>AK</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table> | CV                    | CV                    | PD-L1   | PD-L1 | ISO | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | +<br>AK | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | <table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">ISO</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table><br><table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">+<br/>AK</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | ISO | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | +<br>AK | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | ISO     |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | +<br>AK |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | ISO     |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | +<br>AK |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| 72h ZP                | <table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">ISO</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table><br><table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">+<br/>AK</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table> | CV                    | CV                    | PD-L1   | PD-L1 | ISO | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | +<br>AK | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | <table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">ISO</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table><br><table border="1"> <tr> <td>CV</td> <td>CV</td> <td>PD-L1</td> <td>PD-L1</td> <td rowspan="2">+<br/>AK</td> </tr> <tr> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>∅<br/>INF<sub>γ</sub></td> <td>+<br/>INF<sub>γ</sub></td> </tr> </table> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | ISO | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | CV | CV | PD-L1 | PD-L1 | +<br>AK | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | ISO     |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | +<br>AK |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | ISO     |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| CV                    | CV  | PD-L1                 | PD-L1                 | +<br>AK |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |
| ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub>   | ∅<br>INF <sub>γ</sub> | +<br>INF <sub>γ</sub> |         |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |   |    |    |       |       |     |                       |                       |                       |                       |    |    |       |       |         |                       |                       |                       |                       |

**Abbildung 3: Kennzeichnung der Objektträger**

CV = Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden;

PD-L1 = Zellen, die mit einem Vektor mit der kodierenden Gensequenz für PD-L1 transfiziert wurden;

∅ IFN  $\gamma$  = Medium ohne IFN  $\gamma$ ;

+ IFN  $\gamma$  = Medium mit IFN  $\gamma$ ;

ISO = Zellen mit Isotyp-Kontrolllösung;

AK = Zellen mit Antikörper-Lösung;

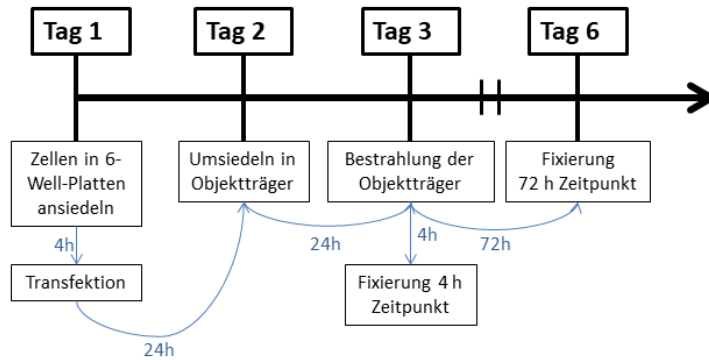
ZP = 4 Std und 72 Std Zeitpunkt;

Gy = Gray;

**Tabelle 25: Zellzahl pro Kammern der Objektträger**

|                      | Fixierung 4 Std nach Radiatio | Fixierung 72 Std nach Radiatio |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Keine Bestrahlung    | 75.000 Zellen                 | 30.000 Zellen                  |
| Bestrahlung mit 8 Gy | 75.000 Zellen                 | 85.000 Zellen                  |





**Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Transfektion bis zur Fixierung**

### 3.4 Fixierung und DAB-Färbung

#### 3.4.1 Fixierung mit Paraformaldehyd

Bevor die PD-L1-Expression der Zellen detektiert wurde, wurden sie 4 und 72 Std nach der Bestrahlung fixiert. Zunächst wurde zu einem 1 x PBS-Puffer mit Calciumchlorid und Magnesiumchlorid (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) 0,1 % Tween (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) hinzugefügt und diese vermengt bis sich die Komponenten gut zu einem „Phosphat Buffered Saline with Tween“ (PBST) verbunden hatten. Daraufhin wurde das serumhaltige Medium der Objektträger (BD Biosciences) vorsichtig abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBST gewaschen. Für die Fixierung wurden die Zellen mit 300 µl einer 2%igen PFA-Lösung (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) pro Kammer überschichtet und damit für 7 bis maximal 10 Min bei RT fixiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Fixierlösung abgegossen und die Zellen wiederholt dreimal mit PBST gewaschen. Bis zum Zeitpunkt der DAB-Färbung wurden die Objektträger (BD Biosciences) mit je 500 µl 1x PBS + CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies) bedeckt und in einer Feuchtekammer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 3.4.2 DAB-Färbung

Damit neben der Anfärbung von membranständigem PD-L1, auch PD-L1 intrazellulär gekennzeichnet werden konnte, wurden die transfizierten Zellen mit Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) permeabilisiert. Hierfür wurde 0,1 %

Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBST gegeben, der 1x PBS (Life Technologies) aus den Kammern abgesaugt, je 300 µl der Mischung hinzugefügt und für 50 – 60 Sekunden (Sek) auf den Zellen belassen. Daraufhin wurde die Permeabilisierungslösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBST gewaschen. Des Weiteren wurde mithilfe von Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) die Peroxidase-Aktivität blockiert, um das Hintergrundsignal zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung aus 10 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,) (Sigma-Aldrich), 10 % Methanol (MeOH) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 80 % 1x PBS (Life Technologies) erstellt. Mit 300 µl pro Kammer wurden die Zellen der Objektträger (BD Biosciences) bedeckt, für 10 Min bei RT inkubiert und danach erneut dreimal mit PBST gewaschen. Während der Inkubationszeit wurde die Blockierungslösung aus PBST und 5 % Normal Goat Serum (NSG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gemischt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden davon 200 µl nach dem letzten Waschgang auf die transfizierten Zellen gegeben und die Bindestellen für 1 Std bei RT abgesättigt. Zwischenzeitlich wurde 3 % Bovin Serum Albumin (BSA) (BIOMOL, Hamburg, Deutschland) in 1 x PBS (Life Technologies) bei 40 °C auf dem Magnetrührer (IKA®-Werke, Staufen, Deutschland) gelöst und die eine Hälfte dieser Mischung mit dem PD-L1 Antikörper (#13684, PD-L1 (E113N), Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland) mit einer Konzentration von 3 µl/ml, die andere Hälfte der Lösung als Negativkontrolle mit einem polyklonalen IgG Antikörper (I5006, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit derselben Konzentration von 3 µl/ml versetzt. Nach Absaugen der Blockierungslösung wurden entsprechend der Beschriftung 200 µl der PD-L1-Antikörper-Lösung oder der Isotyp-Kontrolllösung in die einzelnen Kammern der Objektträger (BD Biosciences) gegeben und über Nacht bei 4 °C und sanfter Bewegung auf dem Kippschüttler (Benchmark Scientific, Edison, USA) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde zuerst die Lösung abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBST gewaschen und für die Signaldetektion pro Kammer 1 Tropfen EnVision (DAKO, Agilent, Carpinteria, USA) zugegeben. Die Objektträger (BD Biosciences) wurden zugedeckt für 30 Min bei RT inkubiert und danach wiederholt dreimal mit PBST gewaschen. Für die immunhistochemische DAB-Färbung wurden die Färbetabletten (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) laut Herstellerprotokoll verwendet und die Zellen mit 200 µl der Lösung für 10 Min bei RT und sanften Bewegungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml normalem,

nicht destilliertem Wasser (Sigma-Aldrich) gestoppt und die Mischung anschließend dekantiert. Die Kammerwände wurden von dem Boden abgetrennt. Um die Proben zu konservieren wurden sie mit jeweils einem Tropfen Eindeckmittel überschichtet. Das „Mounting Medium for Fluorescence“ (Vector Laboratories, Burlingame, USA) enthielt den mit der doppelsträngigen DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (73). Die Zellen wurden mit Deckgläsern (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) abgedeckt. Die Objektträger (BD Biosciences) wurden danach unter 4-facher Vergrößerung mit dem Nikon Fluoreszenzmikroskop (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande), sowohl bei normaler Hellfeldbeleuchtung, als auch bei Fluoreszenz bei 360 nm angeregtem Licht und 460 nm emittiertem Licht zur Auswertung fotografiert.

### **3.4.3 HE-Färbung**

Um zu zeigen, ob die Transfektion der Krebszellen eine Veränderung der Zellmorphologie bewirkt, wurde die Zelllinie PCI 9 mit einem Kontrollvektor (Thermo Fisher Scientific) im selben Verfahren wie in Punkt 3.3.1 transfiziert und danach mittels einer HE-Färbung kenntlich gemacht.

Dazu wurden die transfizierten Zellen mit 2% PFA (Merck Chemicals) in PBS (Gibco) überschichtet und für 7 bis maximal 10 Min bei RT fixiert. Danach wurden die fixierten PCI 9 zweimal mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) gewaschen und daraufhin mit Hämalaun (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) für 5 min bei RT inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Die Objektträger wurden (BD Biosciences) danach für 10 Min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, damit die Strukturen durch die damit verbundene pH-Erhöhung die typische Blaufärbung erhalten. Anschließend wurde mit einer 1 % Eosin-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) für 1 Min gegengefärbt und der Überschuss durch Waschen mit bidest. H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) entfernt. Die Zellen wurden hinterher zuerst für je 10 Sek mit 70 % Ethanol (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) und danach mit 96 % Ethanol (Merck Chemicals), zum Schluss dann zweimal je 2 Min mit 100 % Ethanol (Merck Chemicals) dehydriert. Abschließend wurden die Zellen für 1 - 2 Min mit Xylool (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) inkubiert und mit Vitro-Clude® (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, D) eingedeckt.

### 3.5 Sulfo-NHS-SS-Biotin

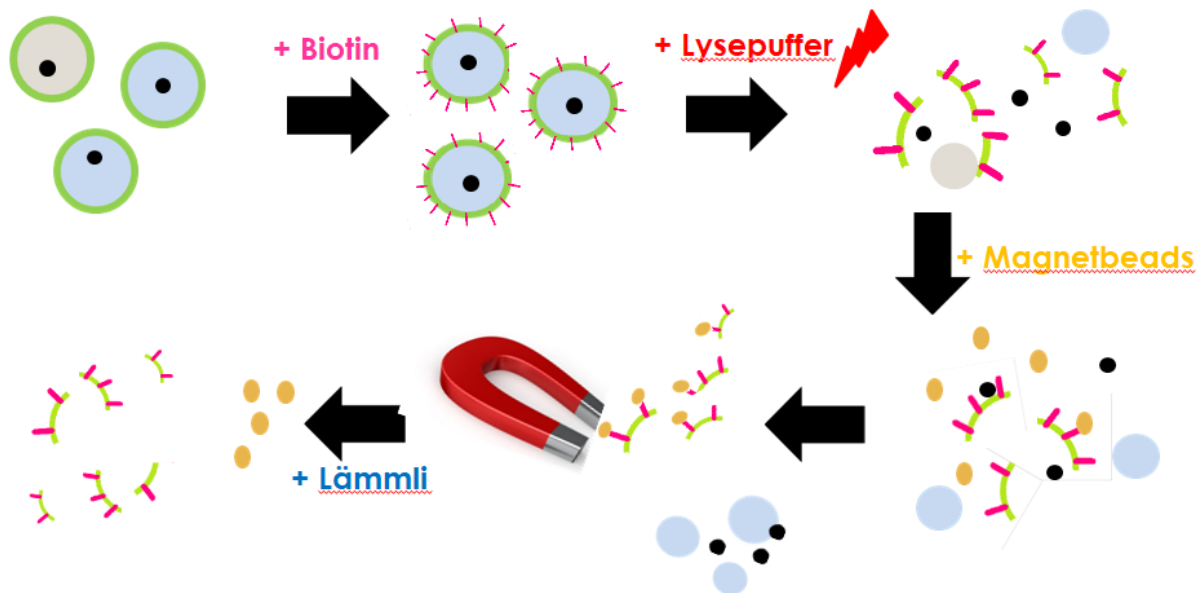
Da für diesen Versuch am Ende nur die Zellmembran benötigt wurde, wurden von allen HNSCC Zelllinien je 20 Millionen Zellen kultiviert. Die Hälfte der Zellschalen (Corning Inc.) wurde durch einen 6-MV-Linearbeschleuniger (Siemens, Clin Oral Invest), wie in Punkt 3.2 beschrieben, bestrahlt. Zum 4 Std und 72 Std Zeitpunkt nach der Bestrahlung wurde die Zellmembran mit Biotin (Thermo Scientific, Rockford, USA) markiert, die Karzinomzellen durch einen Lysepuffer aufgebrochen und die Membranfraktion durch magnetische Kügelchen (TriLink Biotechnologies, San Diego, CA, USA) von den restlichen Zellbestandteilen selektiert. Hierfür wurde ein 1x PBS (Life Technologies) unter Kontrolle mit einem pH-Messgerät (pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments Deutschland, Vöhringen, D) tropfenweise mit einer 1-molaren Natronlauge (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) versetzt bis der Waschpuffer den pH-Wert 8,0 erreicht hatte und wurde daraufhin im Kühlschrank bei 4 °C kalt gestellt. Weiterhin wurde ein Lysepuffer gemischt, welcher unter Punkt 2.7.2 beschrieben ist. Des Weiteren wurde ein 1 x Lämmli hergestellt. Dafür wurden 20 % 5 x Lämmli (vgl. Tabelle 10) mit 80 % bidestilliertem Wasser (Sigma-Aldrich) verdünnt. Währenddessen wurden die magnetischen Kügelchen (Beads) (TriLink Biotechnologies) vorbereitet, indem sie für 1 Min gevortext (Scientific Industries) wurden und je 100 µl in ein neues Tube (Eppendorf AG) gegeben wurden. Die Kügelchen (TriLink Biotechnologies) wurden zweimal mit je 250 µl PBS (pH-Wert 8,0) gewaschen, danach für 2 – 3 Min mithilfe eines Magnetständers (Merck Chemical, Darmstadt, D) fixiert, um den Überstand verwerfen zu können.

Nachdem die Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurde einleitend das Medium der Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten abgesaugt, die HNSCC Zellen mit PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen, die Zellen mit 1 ml Accutase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) pro Zellflasche bedeckt und für 10 Min im Brutschrank (Thermo Scientific) inkubiert. Nachdem sich diese vom Boden gelöst hatten, wurden sie pro Zellflasche (Corning Inc.) in 5 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und in einem 50 ml Tube (Corning Inc., Corning, USA) gesammelt. Die Tubes (Corning Inc.) wurden daraufhin bei RT für 5 Min bei 220 relativer Zentrifugalbeschleunigung (RCF) zentrifugiert (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 15 ml eiskaltem PBS (pH-Wert 8,0) resuspendiert.

Dieser Arbeitsschritt wurde nochmals wiederholt und danach die Zellzahl, wie in Punkt 3.1.2 beschrieben, bestimmt. Daraufhin wurden aus der Suspension  $2 \times 10^7$  vitale und nicht vitale Zellen entnommen, in ein neues Tube (Corning Inc.) gegeben und bei 220 RCF für 5 Min zentrifugiert (Andreas Hettich GmbH). Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS (pH-Wert 8,0) resuspendiert und die Suspension in ein 2 ml Eppendorftube (Eppendorf AG) überführt. Dazu wurden 65  $\mu$ l der 10-millimolaren Biotin Stocklösung (Thermo Scientific) gegeben und das Gemisch für 30 Min auf der Drehscheibe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) bei 5 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 ml eines 25-millimolarem Tris (pH-Wert 8,0) (Merck Chemicals) wurde die Reaktion abgestoppt (Quenching). Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (pH-Wert 8,0) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (Andreas Hettich GmbH) für 5 Min bei 4 °C und 220 RCF abgesaugt, um ungebundenes Sulfo-NHS-SS-Biotin zu entfernen. Um die Zellen zu lysieren wurden 900  $\mu$ l des Lysepuffers auf das Zellpellet gegeben und gut resuspendiert, das Tube (Eppendorf AG) gevortext (Scientific Industries) und für 15 Min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Tube (Eppendorf AG) für 10 Min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert (Sigma-Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) um die Zellen zusätzlich mechanisch aufzubrechen und die unlöslichen Schwebstoffe zu entfernen.

Nach der Zentrifugation der Zellen wurde der biotinylierte Zellüberstand abgenommen, zu den magnetischen Kügelchen (TriLink Biotechnologies) gegeben und das Tube (Eppendorf AG) für 30 Min auf der Drehscheibe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) bei 5 rpm bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Tubes (Eppendorf AG) für 2 Min in den Magnetständer (Merck Chemical, Darmstadt, D) gestellt. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die an die Kügelchen (TriLink Biotechnologies) gebundenen Bestandteile zweimal mit 250  $\mu$ l PBS (pH-Wert 8,0) gewaschen. Um letztendlich die Magnetkügelchen (TriLink Biotechnologies) von den Zellmembranen zu lösen, wurden sie pro Tube (Eppendorf AG) mit 90  $\mu$ l 1x Lämmli resuspendiert und für 10 Min bei 70 °C im Heizblock (DITABIS AG – Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim, Deutschland) erhitzt. Die Tubes (Eppendorf AG) wurden danach in den Magnetständer (Merck Chemical, Darmstadt, D) gestellt, der Überstand abgenommen und bei -20 °C weggefroren. Vor dem Einsetzen in den Western Blot wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay, wie in Kapitel 3.7.1 ausgeführt, bestimmt und daraufhin ein Volumen mit 30  $\mu$ g

Protein jeder Probe in den Western Blot eingesetzt. Dabei wurde, wie in Punkt 3.7.3 beschrieben, verfahren.



### Abbildung 5: Schematische Darstellung des Sulfo-NHS-SS-Biotin-Versuchs

Die Membran wurde mit Biotin markiert und die Zellen daraufhin mittels Puffer lysiert. Die mit Biotin markierten Membranfragmente wurden an die magnetischen Kügelchen gebunden und durch einen Magnet von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Um die Membranbestandteile zu denaturieren und von den Magnetkügelchen zu lösen, wurden diese mit 1x Lämmli bei 70 °C für 10 Min erhitzt.

### 3.6 Proteinisolation verschiedener Zellfraktionen

Zu Beginn wurden die verschiedenen Kopf- und Halstumorzellen in T75 Zellflaschen (Corning Inc.) bis zu einer Konfluenz von 75 – 80 % kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurden, wie in Punkt 3.2 dargestellt, bestrahlt. Daraufhin wurden die Zellen mittels ProteoExtract® (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) laut Herstellerprotokoll 4 und 48 Stunden nach der Bestrahlung in die Fraktionen Membran, Zytoplasma, Zytoskelett und Kern aufgetrennt und die Proteine daraus isoliert. Dafür wurde zuerst das Medium aus den Kulturflaschen (Corning Inc.) abgesaugt und die adhären Zellen mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer für 5 Min bei 4 °C und sanfter Bewegung auf dem Kippschüttler (Benchmark Scientific) gewaschen. Nachfolgend wurde der Puffer abgesaugt und dieser Waschvorgang ein zweites Mal wiederholt. Danach wurden 3 ml des Extraktionspuffers 1 und 15 µl des Protease-Inhibitor-Cocktails gemischt

und die Zellen damit für 10 Min bei 4 °C auf dem Kippschüttler (Benchmark Scientific) bei leichten Bewegungen inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein 50 ml-Tube (Corning Inc.) gegeben, mit „Fraktion 1“ beschriftet und auf Eis gestellt. Dabei wurde ein dünner Flüssigkeitsfilm auf den Zellresten in der T75-Flasche (Corning Inc.) belassen. Erneut wurden 3 ml des Extraktionspuffers 2 und 15 µl des Protease-Inhibitor-Cocktails vermengt und die verbliebenden Zellbestandteile in der Kulturflasche (Corning Inc.) für 30 Min bei 4 °C auf dem Kippschüttler (Benchmark Scientific) inkubiert. Der Überstand wurde wiederholt unter Belassen eines dünnen Flüssigkeitsfilms vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml-Tube (Corning Inc.) (Fraktion 2) gegeben und auf Eis gelagert. Als nächstes wurden 1,5 ml Extraktionspuffer 3, 15 µl Protease-Inhibitor-Cocktail und 4,5 µl Benzonase angerührt und in die T75-Flasche (Corning Inc.) gegeben. Die Zellreste wurden damit für 10 Min unter sanfter Bewegung für 4 °C inkubiert. Der komplette Überstand (Fraktion 3) wurde in ein neues 50 ml-Tube (Corning Inc.) überführt und auf Eis gekühlt. Zuletzt wurden 1,5 ml des Extraktionspuffers 4 und 15 µl Protease-Inhibitor-Cocktail zusammengemischt und auf den am Flaschenboden verbliebenen Anteil der Zellen gegeben. Die T75-Flaschen (Corning Inc.) wurden solange geschwenkt bis sich alle Fragmente vom Boden abgelöst hatten und in ein neues Tube (Corning Inc.) (Fraktion 4) überführt. Der den Fraktionen entsprechende Zellbestandteil ist in Tabelle 25 aufgelistet. Da die Proteinkonzentration bei dem eingesetzten Volumen der Extraktionspuffer zu gering für einen aussagekräftigen Western Blot waren, wurden die einzelnen Fraktionen eingeengt. Dazu wurden die Fraktionen in Ultrazentrifugeneinheiten (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) mit einer Porengröße von 3 kDa gegeben und bei 7500 RCF zentrifugiert (Sigma-Laborzentrifugen). Fraktion 1 und 2 wurden dabei für 120 – 130 Min bei 4 °C, Fraktion 3 und 4 für 60 – 90 Min bei RT zentrifugiert und das Volumen damit verringert. Die RT wurde hierbei gewählt, da bei kühleren Temperaturen Teile der Extraktionspuffer 3 + 4 kristallisierten und die Einengung dadurch behindert wurde. Die Proben wurden bis zur Verwendung für die Proteinkonzentrationsbestimmung (vgl. Punkt 3.7.1) und den darauffolgenden Western Blot bei -20 °C weggefroren. Für den Western Blot wurden 30 µg Protein pro Probe eingesetzt und, wie in Punkt 2.7.3 dargelegt, vorgegangen. Um die Reinheit der Proben zu überprüfen, wurde die Membran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zum Nachweis der Zytosol-Fraktion mit einem Antikörper

gegen GAPDH (ab9385 HRP Konjugiert, Abcam, Cambridge, UK) zum Nachweis der Membran-Fraktion mit einem Antikörper gegen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (#3010, Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D), zum Nachweis der Kern-Fraktion mit einem Antikörper gegen Lamin A/C (#2032, Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D) und zum Nachweis der Zytoskelett-Fraktion mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin (#2128, Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main, D) inkubiert und entwickelt.

**Tabelle 26: Zellbestandteile der einzelnen Fraktionen**

|            |             |
|------------|-------------|
| Fraktion 1 | Zytosol     |
| Fraktion 2 | Membran     |
| Fraktion 3 | Kerne       |
| Fraktion 4 | Zytoskelett |

### 3.7 Proteinbiochemie

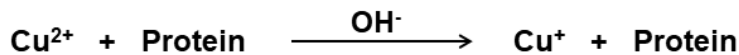
#### 3.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde durch einen Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Test) bestimmt. (vgl. Abb. 6) Die Absorption wird bei einem Maximum von 562 nm photometrisch gemessen und damit die Proteinkonzentration bestimmt. Diese wird anhand einer Standardkurve berechnet, welche durch Messung von Albumin-Standards mit bekannter Konzentration erstellt werden kann (74). Dazu wurde ein BCA-Reagenz, wie in Tabelle 8 beschrieben, hergestellt und je 200  $\mu$ l davon pro Well in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Zum einen wurden hier je 10  $\mu$ l der Albumin-Standards mit den Konzentrationen 0, 50, 125, 250, 500, 750, 1000 und 1500  $\mu$ g/ml hinzugefügt, welche durch die Verdünnung eines Albumin-Standards (c = 2,0 mg/ml) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) mit RIPA-Lysepuffer (vgl. Tabelle 8) hergestellt worden sind. Zum anderen wurden 2  $\mu$ l der Probe (1 : 5) zu der BCA-Reagenz dazugegeben. Standard und Proben wurden in technischen Replikaten aufgetragen, um Schwankungen der Proteinkonzentration durch Pipettierfehler zu minimieren. Die 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) wurde danach für 20 - 30 Min bei 37 °C im Brutschrank (Thermo Scientific) inkubiert bis ein deutlicher Farbumschlag sichtbar war. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Platte

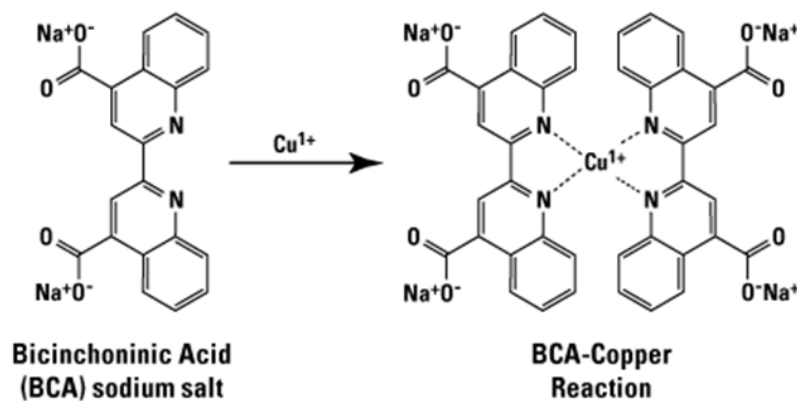


daraufhin kurz für 2 Min bei 4 °C abgekühlt. Die photometrische Messung der Lösungen erfolgte bei 595 nm mit dem GENios Plattenphotometer (Tecan Group, Männedorf, Schweiz). Mithilfe des Programmes Magellan6 (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) wurde die Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben errechnet.

### 1. Reaktion:



### 2. Reaktion:



### Abbildung 6: Nachweisreaktionen beim BCA-Assay

Zweiwertige Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) werden in einer wässrig-alkalischen Lösung durch Peptidverbindungen, wie Cystin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan zu einwertigen Kupferionen ( $\text{Cu}^+$ ) reduziert. Zwei Bicinchoninsäuremoleküle reagieren mit einem einwertigen Kupferion zu einem Komplex mit violetter Farbe. (75)

Quelle: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html> (2020)

### 3.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese anhand ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit

Proteinen mit unterschiedlichem bekanntem Molekulargewicht wurde bei jedem Gel als Referenzwert und Größenmarker herangezogen.

### **3.7.2.1 Probenvorbereitung**

30 µg Protein wurde mit einem Teil 5x Lämmli (vgl. Tabelle 10) und vier Teilen bidestilliertem Wasser (Sigma-Aldrich) vermischt und bei 70 °C im Heizblock (DITABIS AG – Digital Biomedical Imaging Systems AG) für 10 Min denaturiert.

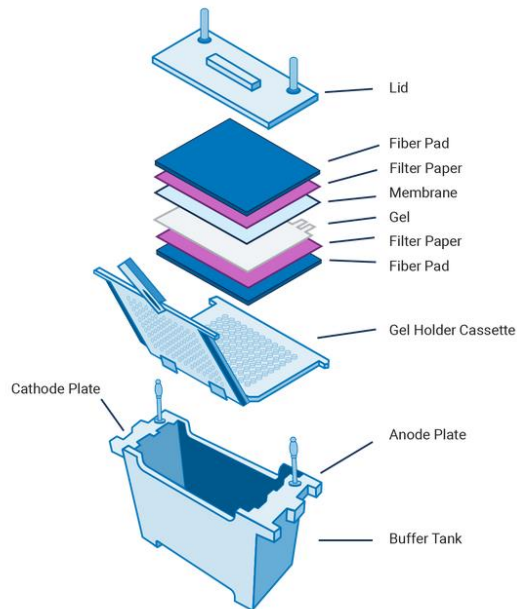
### **3.7.2.2 Gelelektrophorese**

Daraufhin wurden ein 10%iges Acrylamid-Trenngel und ein 4%iges Acrylamid-Sammelgel, wie in Punkt 2.7.2.2 beschrieben, gegossen und in die Vorrichtung eingespannt. Die Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde mit 1x Elektrodenpuffer (vgl. Tabelle 13) bis zum Rand befüllt, die Kämme (Bio-Rad Laboratories GmbH) vorsichtig entfernt und die Taschen mit einer feinen Spitze gespült, um Rückstände aus den Taschen zu schwemmen. Die gesamte Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurde nun in das Elektrophoresegerät (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) eingebracht und dieses entsprechend der Markierung mit 1x Elektrodenpuffer (vgl. Tabelle 14) aufgefüllt. Nun wurden die Proben und 10 µl des Precision Plus Dual Color Protein Standards (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) als Standardmarker langsam in die einzelnen Taschen pipettiert. An die Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurde eine gleichbleibende Spannung von 70 V angelegt und diese nach Durchlaufen des Sammelgels auf 120 V erhöht. Bevor die Lauffront den Unterrand des Gels erreicht hatte, wurde die Spannung auf 0 V zurückgeführt.

### **3.7.3 Western Blot**

Um einen Antikörpernachweis von Zielproteinen zu ermöglichen, wurden im Acrylamidgel befindliche Proteine auf eine PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) transferiert. Dazu wurde nach der Gelelektrophorese die Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) aus dem Gerät genommen, die Glasplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH) vorsichtig vom Gel abgehoben und das Trenngel mithilfe eines

Spatels vom Sammelgel abgetrennt. Für die Übertragung der Proteine wurden pro Gel je zwei Schwämmchen (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und vier Whatman®-Blottingpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 1x Blotpuffer (vgl. Tabelle 16) getränkt und daraufhin die Blottingkassetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) vorbereitet. Dabei wurden von außen nach innen je ein Schwämmchen (Bio-Rad Laboratories GmbH) und 2 Whatman®-Blottingpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufeinandergelegt. Hierauf wurde das Acrylamid-Gel positioniert und die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH), die zuvor in 100 % Ethanol (Merck Chemicals) für die Aufnahme der Proteine aktiviert und danach in 1x Blotpuffer äquilibriert wurde, blasenfrei auf dem Gel platziert. Die Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurde mit zwei Whatman®-Blottingpapieren (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und einem Schwämmchen (Bio-Rad Laboratories GmbH) abgedeckt, die Kassette (Bio-Rad Laboratories GmbH) geschlossen in den Blotting-Tank (Bio-Rad Laboratories GmbH) gestellt und mit einem Kühl-Akku und einem Liter 1x Blotpuffer bis zur Markierung aufgefüllt (vgl. Abb. 7). Die Stromstärke am Gerät wurde auf 140 mA eingestellt und die Proteine ungefähr 70 min auf die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) transferiert. Durch die Denaturierung der Proteine mit SDS (Carl Roth GmbH) werden diese einheitlich negativ geladen. Dies ermöglicht einerseits die Auftrennung nach Molekulargewicht ohne, dass die Ladung einen Störfaktor darstellt, und andererseits die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) in Richtung Pluspol.



**Abbildung 7: Reihenfolge der einzelnen Komponenten vor dem Proteintransfer**

Quelle: [https://www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer\\_options](https://www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer_options) (2020)

Nachdem die Proteine auf die Membran (Roche Diagnostics GmbH) übertragen wurden, wurde diese für 45 – 60 Min entsprechend der darauffolgenden Antikörper-Lösung in 5%-Milch oder 3%-BSA-Lösung inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen zu blockieren. Dazu wurden zuvor 5 % Milchpulver (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TBST (vgl. Tabelle 18) oder 3 % BSA-Pulver (BIOMOL) in 1x TBST gelöst. Danach wurde die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) entnommen und dreimal mit 1x TBST für fünf Min gewaschen. Der jeweilige Primärantikörper wurde wie in Tabelle 26 dargestellt in 5%-Milch oder 5%-BSA-Lösung verdünnt und die Membran (Roche Diagnostics GmbH) damit über Nacht auf dem Kippschüttler bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 27: Verwendete Primärantikörper**

| Antikörper                              | Verdünnung | Konzentration | Lösung    | Proteingröße |
|---|------------|---------------|-----------|--------------|
| GAPDH                                   | 1:5000     | 0,1 µg/ml     | 5 % BSA   | 38 kDa       |
| Lamin A/C                               | 1:1000     | 0,1 µg/ml     | 5 % BSA   | 28/70 kDa    |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase | 1:1000     | 0,1 µg/ml     | 5 % BSA   | 100 kDa      |
| PD-L1                                   | 1:1000     | 0,1 µg/ml     | 5 % Milch | 30/50 kDa    |
| β-Aktin                                 | 1:10000    | 0,01 µg/ml    | 5 % BSA   | 42 kDa       |
| β-Tubulin                               | 1:1000     | 0,1 µg/ml     | 5 % BSA   | 55 kDa       |

Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran (Roche Diagnostics GmbH) am darauffolgenden Tag dreimal in 1x TBST für je 5 Min gewaschen daraufhin für 1 Std mit dem entsprechenden HRP(Meerrettich-Peroxidase-Enzym)-konjugierten Sekundärantikörper bei RT inkubiert und anschließend wiederholt dreimal mit 1x TBST für je 5 Min gewaschen. (vgl. Tabelle 28) Eine Ausnahme bildet dabei der GAPDH-Primärantikörper, welcher bereits HRP-konjugiert ist, weswegen dieser Schritt hier übersprungen werden konnte.

**Tabelle 28: Verwendete Sekundärantikörper**

| Sekundärantikörper                               | Verdünnung | Konzentration |
|--|------------|---------------|
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-konjugiert       | 1:1000     | 0,01 µg/ml    |
| Rabbit TrueBlot® Anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert | 1:1000     | 1 µg/ml       |

Um die Proteine durch die Chemilumineszenz zu detektieren, wurde die Membran (Roche Diagnostics GmbH) nach der Reinigung abgetropft und auf einen Parafilm (Bemis Company, Neenah, WI, USA) abgelegt. Hierauf wurde nun einerseits 1 ml des Chemilumineszenz-Substrats SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) zum Nachweis von PD-L1 und andererseits 1 ml der Entwickler-Reagenz Roti®-Lumin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zum Nachweis von GAPDH (Abcam), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Cell Signaling Technology Inc.), β-Tubulin (Cell Signaling Technology Inc.), β-Aktin (#8227, Abcam, Cambridge, UK) und Lamin A/C (Cell Signaling Technology Inc.) hinzugegeben und

die Membran (Roche Diagnostics GmbH) unter leichtem Schwenken, abgedunkelt, bei RT damit für 1 - 2 Min inkubiert. Diese wurde anschließend nass und blasenfrei in eine Prospekthüllen (InterES GmbH, Nürnberg, Deutschland) gelegt und mit dem ChemiDoc XRS+ Imaging System Programm (BioRad, Hercules, CA, USA) in einem Zeitraum zwischen 20 - 600 Sek belichtet. Um die Antikörperbindestellen auf der PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) freizulegen und erneut mit einem anderen Antikörper inkubieren zu können, wurde sie nach der Entwicklung dreimal mit 1x TBST gewaschen und für 10 Min in ReBlot Plus Stripping Solution (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Daraufhin wurde diese erneut dreimal für je 5 Min mit 1x TBST gewaschen und die Arbeitsschritte mit dem nächsten Antikörper wiederholt. Zur Bestimmung einer Ladekontrolle wurde das Gesamtprotein mit einer Ponceau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt.

## **4. Ergebnisse**

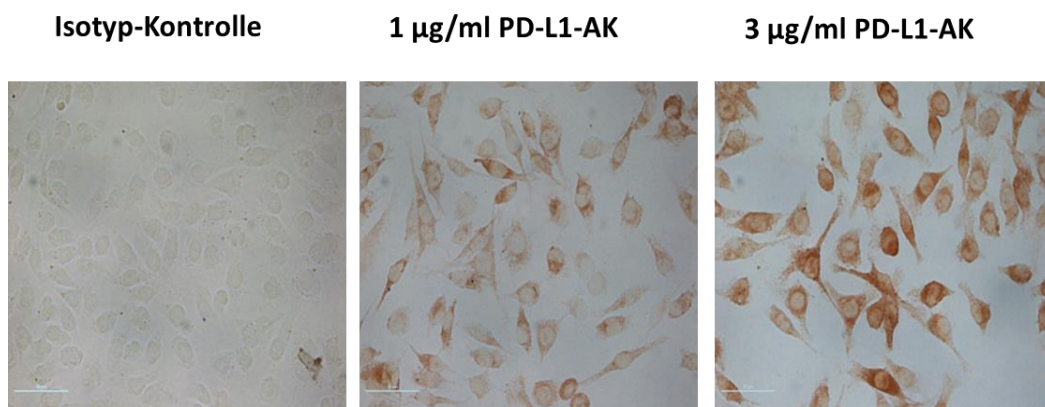
In Vorversuchen der AG Bauer, welche die Grundlage für diese experimentelle Arbeit darstellten, wurden die drei radiosensitiven (RS) Kopf- und Halstumorzelllinien (HNSCC) PCI 1, PCI 9 und PCI 13 sowie die drei radioresistenten (RR) Kopf- und Halstumorzelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 ermittelt. Die radioresistenten Zelllinien zeichneten sich im Vergleich zu den radiosensitiven Zellen durch eine höhere Vitalität, ein verlängertes Überleben sowie eine verminderte und verzögerte Apoptoserate nach einer Radiatio aus. Dabei konnte im Zellysat aller Zelllinien auf Gen- und Proteinexpressionsebene PD-L1 nachgewiesen werden, wobei die PD-L1-Gesamtexpression bei den radioresistenten Zelllinien signifikant höher war als bei den RS. Anschließend wurde die PD-L1-Expression der Tumorzellen vor und nach einer Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 4 Gy und 8 Gy analysiert, um zu testen, ob die Bestrahlung einen Einfluss auf die PD-L1-Expression hat. Hierbei wurde ein signifikanter, strahlendosisabhängiger Anstieg der Gesamtexpression von PD-L1 in den radioresistenten Zellen beobachtet. Daraufhin sollte in dieser Arbeit untersucht werden in welchen Zellkompartimenten sich die PD-L1-Expression nach einer Bestrahlung ändert und ob die Lokalisation von PD-L1 im Zusammenhang mit der Vermittlung einer Radioresistenz der Zellen stehen könnte. (76)

### **4.1 PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien als Selektionsvorteil nach der Bestrahlung**

In Vorversuchen der AG Bauer wurde gezeigt, dass eine Reduktion der PD-L1-Expression in RR Zelllinien mit hoher PD-L1-Basalexpression eine Verringerung der Proliferation bewirkte (76). Nach dem Knockdown von PD-L1 wurde auch eine Radiatio mit 8 Gy durchgeführt. Die Verringerung der Proliferationsrate nach dem Knockdown war strahlungsunabhängig. Ergänzend dazu sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob eine PD-L1 Überexpression in den RS Zelllinien mit geringer PD-L1-Basalexpression einen Selektionsvorteil nach Bestrahlung bot. Hierfür wurde der Anteil PD-L1-positiver Zellen an der Gesamtpopulation vor und nach Radiatio ermittelt.

#### 4.1.1 Etablierung der DAB-Färbung zur Bestimmung PD-L1-positiver Zellen

Für die Bestimmung des Anteils PD-L1-positiver Zellen an der Gesamtpopulation wurde die optimale PD-L1-Antikörper-Konzentration ermittelt. Für die Etablierung wurde die Zelllinie PCI 52 gewählt, da diese die höchste PD-L1-Basalexpression aller verwendeten Zelllinien aufweist. Die Abbildung 8 zeigt in drei lichtmikroskopischen Aufnahmen die Detektion des PD-L1-Primärantikörpers nach der immunzytochemischen DAB-Färbung. Die PD-L1-Expression der Zellen war als Orange-/Braunfärbung erkennbar. Die Inkubation mit 3 µg/ml PD-L1-Antikörper zeigte ein stärkeres Signal als die Inkubation mit 1 µg/ml. Bei einer Konzentration über 3 µg/ml konnte keine weitere Verstärkung des Signals wahrgenommen werden (nicht-gezeigt). Die Isotyp-Kontrolle, eine Inkubation mit 3 µg/ml polyklonalem IgG-Rabbit-Antikörper, zeigte keine unspezifischen Signale. Die Antikörper-Konzentration von 3 µg/ml wurde basierend auf diesem Etablierungsexperiment für die weiteren Versuche gewählt.



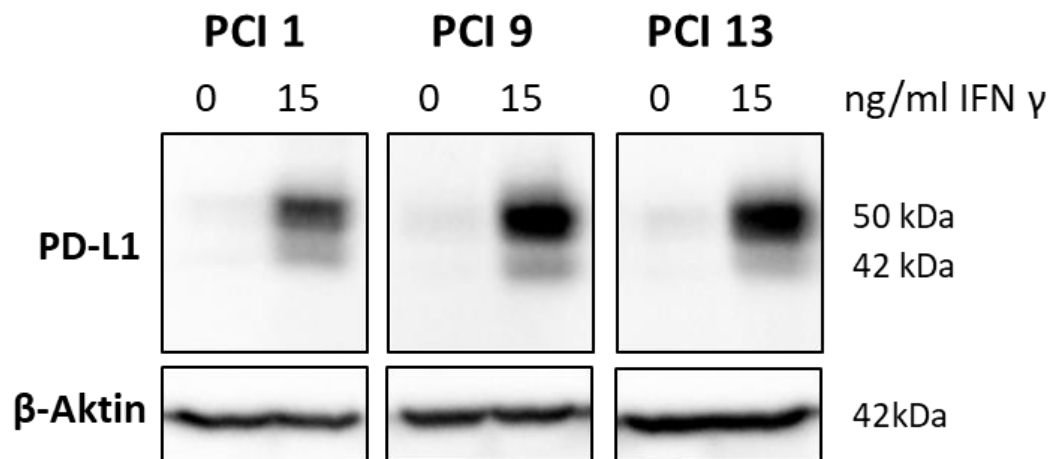
**Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme in 10-facher Vergrößerung zur Bestimmung der optimalen PD-L1-Antikörper-Konzentration; Balkenmaß: 50 Mikrometer (µm);**

#### 4.1.2 Überexpression von PD-L1 durch Interferon $\gamma$

Um den PD-L1 Gehalt in RS Zelllinien mit niedriger PD-L1-Basalexpression zu steigern, wurde die PD-L1-Expression durch IFN  $\gamma$  induziert und verstärkt. Die Abbildung 9 zeigt einen Western Blot zur Bestimmung der PD-L1-Expression nach



20 h Inkubation mit 15 ng/ml IFN  $\gamma$ . Die PD-L1-Expression konnte in den Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 im Mittel um den Faktor 12,3 ( $\pm$  3,1 Standardabweichung (SD)) induziert werden. Dazu wurden die Proben durch die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und mit dem Programm GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) relativ quantifiziert.

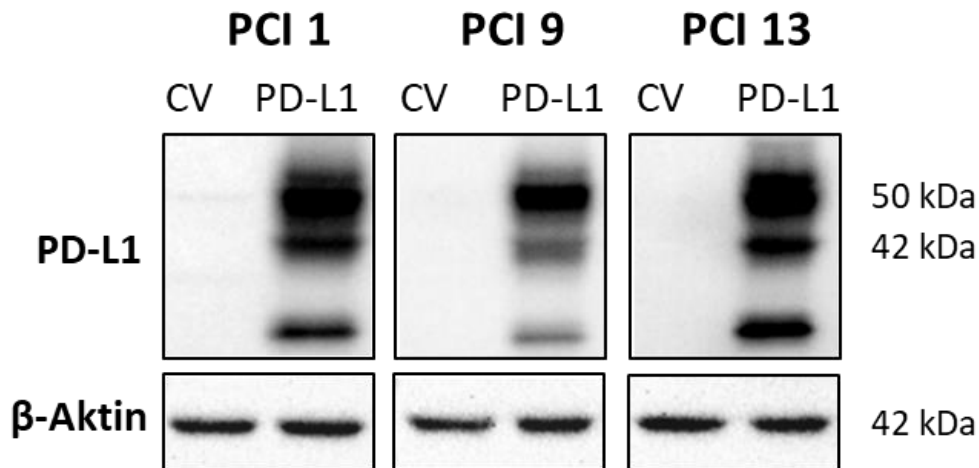


**Abbildung 9: Western Blot zur Bestimmung der PD-L1-Expression nach Inkubation mit 15 ng/ml IFN  $\gamma$ .**

Das Zellkulturmedium ohne IFN  $\gamma$  diente zur Kontrolle und zeigte eine deutlich geringere PD-L1-Basalexpression der Zelllinien.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

#### 4.1.3 Überexpression von PD-L1 durch transiente Plasmid-Transfektion

Um den PD-L1 Gehalt in radiosensitiven Zelllinien mit niedriger PD-L1-Gesamtexpression zu steigern, wurde die PD-L1-Expression durch transiente Plasmid-Transfektion induziert. Abbildung 10 zeigt einen Western Blot zur Bestimmung der Transfektions-Effizienz. PD-L1 konnte in den Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 im Mittel um den Faktor 33,8 ( $\pm$  3,6 SD) signifikant erhöht werden. Dazu wurden die Proben durch die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und mit dem Programm GraphPad (GraphPad Software, Inc.) relativ quantifiziert.



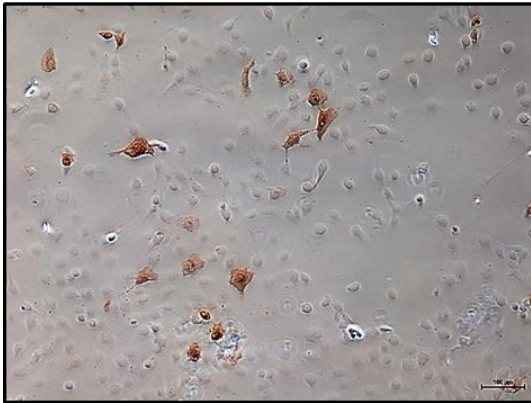
**Abbildung 10: Western Blot zur Bestimmung der Transfektions-Effizienz.**

Dabei zeigt sich eine deutlich erhöhte PD-L1-Expression nach Transfektion. Der Leervektor (Kontrollvektor CV) diente zur Kontrolle;  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle;

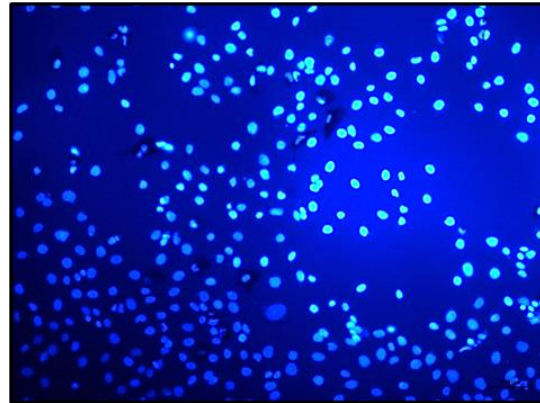
#### 4.1.4 Bestimmung des Anteils PD-L1-positiver Zellen nach Bestrahlung

In den radiosensitiven Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 mit geringer PD-L1-Basalexpression wurde der PD-L1 Gehalt durch die Überexpression mittels einer transienten Plasmid-Transfektion und zum Teil gleichzeitiger Stimulation durch IFN  $\gamma$  maximiert (77). Um die PD-L1-positiven Zellen nachzuweisen, wurden diese 4 Std und 72 Std nach der Bestrahlung fixiert und wie in Abbildung 11 dargestellt durch eine immunzytochemische Färbung mittels DAB kenntlich gemacht. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, welches mit der doppelsträngigen DNA interkaliert und fluoreszierende Komplexe mit Adenin-/Thymin-reichen DNA-Sequenzen bildet und damit alle einzelnen Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellt (73). Die Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop bei 4-facher Vergrößerung aufgenommen. Unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ wurden die PD-L1-positiven Zellen ausgezählt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Damit wurde der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen errechnet.

**DAB-Färbung zur Bestimmung  
PD-L1-positiver Zellen**



**DAPI-Färbung zur Bestimmung  
der Gesamtzellzahl**



**Abbildung 11: DAB- und DAPI-Färbung nach PD-L1 Überexpression der  
PCI 9**

Links: Aufnahme unter dem Lichtmikroskop in 4-facher Vergrößerung zur Bestimmung des Anteils PD-L1-positiver Zellen;

Rechts: Aufnahme unter dem Fluoreszenzmikroskop in 4-facher Vergrößerung zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Kernfärbung;

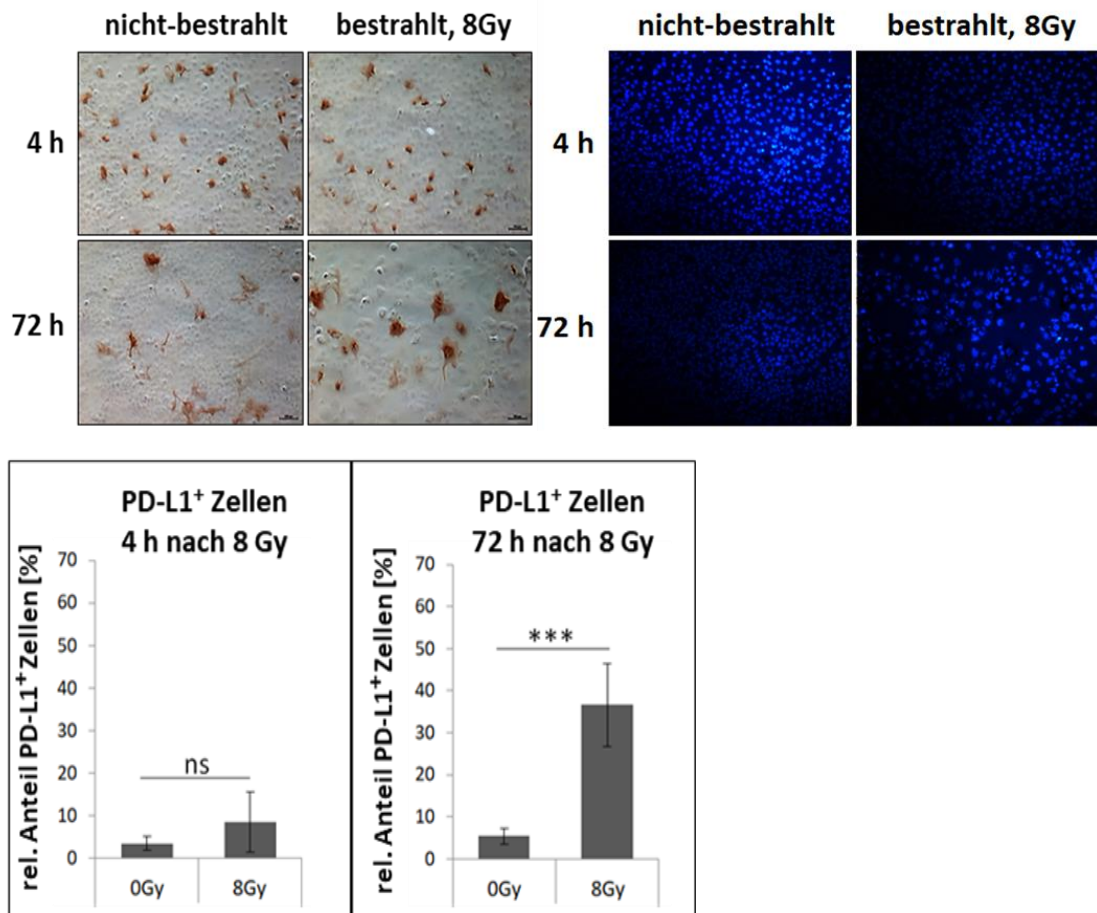
Balkenmaß: 100 µm;

#### **4.1.5 PD-L1-Expression als Selektionsvorteil für radiosensitive HNSCC-Zelllinien nach Radiatio**

Um zu prüfen, ob ein erhöhter PD-L1 Gehalt das Überleben der Zellen nach einer Bestrahlung begünstigt, wurden die radiosensitiven Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 nach PD-L1 Überexpression mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Nicht bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden nach 4 Std und 72 Std nach der Radiatio analysiert. Abbildung 12 zeigt anhand der repräsentativen Zelllinie PCI 9, dass PD-L1 von radiosensitiven Tumorzellen überexprimiert wurde.

4 Std nach der Bestrahlung konnte kein signifikanter Unterschied beim Anteil der PD-L1-positiven Zellen im Vergleich zwischen nicht bestrahlten Zellen mit  $3,4 \% \pm 1,7 \%$  und bestrahlten Zellen mit  $8,4 \% \pm 7,1 \%$  bei einem Kulturmedium mit IFN  $\gamma$  beobachtet werden. Allerdings war 72 Std nach der Radiatio zu sehen, dass der Anteil der PD-L1-positiven Kopf- und Halstumorzellen bei den mit IFN  $\gamma$  stimulierten Proben bei den Zellen, die keiner Bestrahlung ausgesetzt waren, mit

5,4 % ± 2 % signifikant niedriger war als bei den bestrahlten Zellen mit 36,6 % ± 9,8 %. (vgl. Abb. 12)

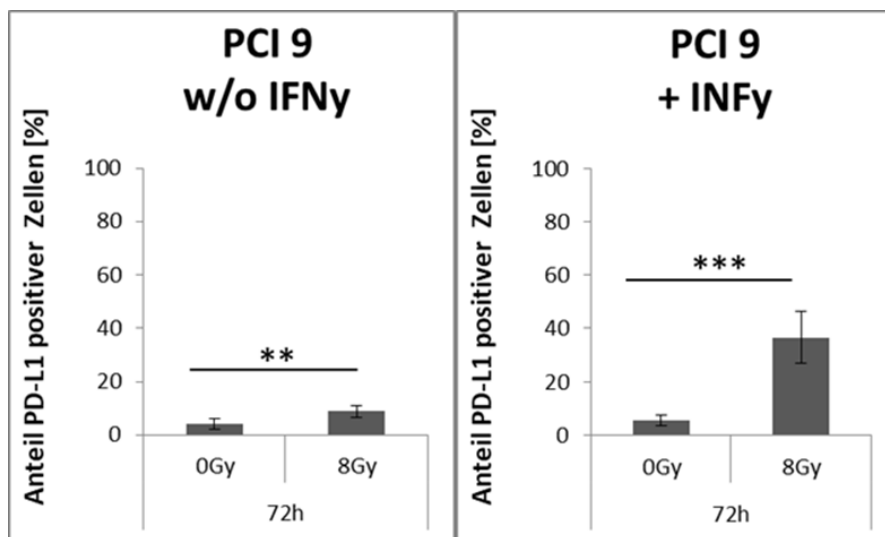


**Abbildung 12: Relativer Anteil PD-L1-positiver PCI 9 im Kulturmedium mit IFN  $\gamma$ ;** Die PD-L1-Expression wurde mittels transienter Plasmid-Transfektion induziert. 4 Std und 72 Std nach Bestrahlung mit 8 Gy wurde der relative Anteil PD-L-positiver Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent [%] berechnet. PD-L1-positive Zellen wurden mittels DAB-Färbung detektiert (braun) (links). Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt (rechts). 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);

Balkenmaß: 100  $\mu$ m;

Gleicherweise konnte auch ohne IFN  $\gamma$  Zugabe nach 4 Std zwischen unbestrahlten Zellen (7 % ± 1,5 %) und bestrahlten PCI 9 (5 % ± 1 %) kein wesentlicher

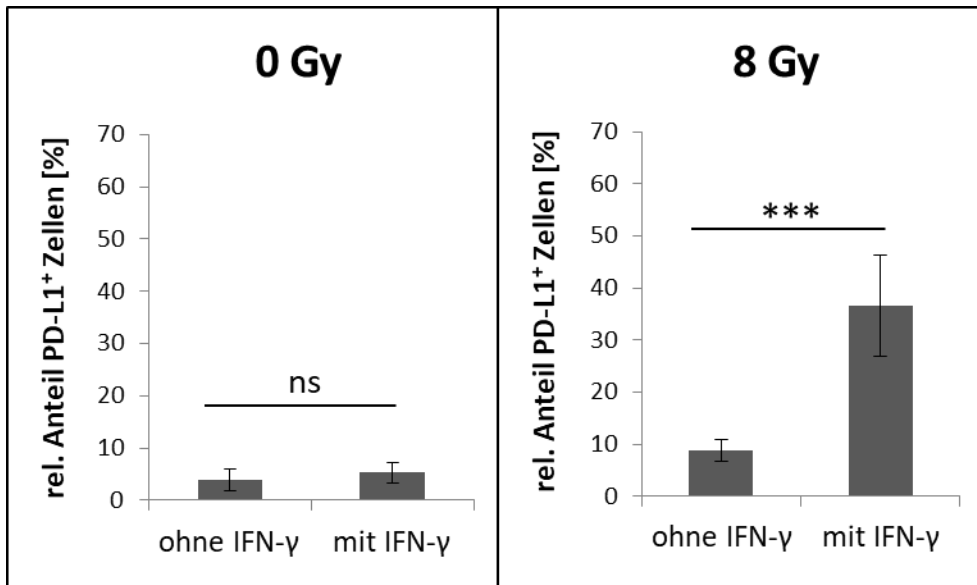
Unterschied am relativen Anteil PD-L1-positiver Zellen festgestellt werden. Dagegen war 72 Std nach der Bestrahlung die Zahl der adhärenenten transfizierten Zellen im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle deutlich geringer. Der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen war in der unbestrahlten Kontrolle mit  $4\% \pm 2\%$  im Vergleich zu den bestrahlten Zellen mit  $8,8\% \pm 2\%$  signifikant geringer. Dabei ist erkennbar, dass sich bei einem Kulturmedium ohne  $\text{IFN } \gamma$  schon eine Tendenz zeigt, dass der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen nach einer Bestrahlung höher ist. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von  $\text{IFN } \gamma$  noch deutlich verstärkt. (vgl. Abb. 13)



**Abbildung 13: Auswirkungen von  $\text{IFN } \gamma$  auf den PD-L1 Gehalt**

Anteil PD-L1-positiver Zellen in Prozent (%) 72 Std nach Radiatio mit 0 Gy und 8 Gy, nach vorheriger transientser Plasmid-Transfektion im Kulturmedium ohne und mit  $\text{IFN } \gamma$ . PD-L1-positive Zellen wurden mittels DAB-Färbung detektiert. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit 4x Vergrößerung aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte mit dem Programm ImageJ. N=3, Student's T-Test (\*\*  $p = < 0,01$ ; \*\*\*  $p = < 0,001$ );

Weiterhin zeigt sich, dass der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen im Kulturmedium mit  $\text{IFN } \gamma$  erst nach einer Bestrahlung der Zellen mit 8 Gy signifikant erhöht ist. (vgl. Abb. 14)



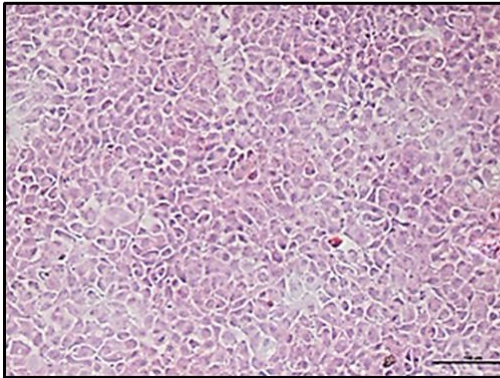
**Abbildung 14: Auswirkungen der Bestrahlung mit 8 Gy auf den PD-L1 Gehalt der Zelllinie im Kulturmedium ohne und mit IFN  $\gamma$ ;**

PD-L1-positive Zellen wurden mittels DAB-Färbung detektiert. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit 4x Vergrößerung aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte mit dem Programm ImageJ. N=3, Student's T-Test (ns = nicht signifikant; \*\*\*  $p = < 0,001$ );

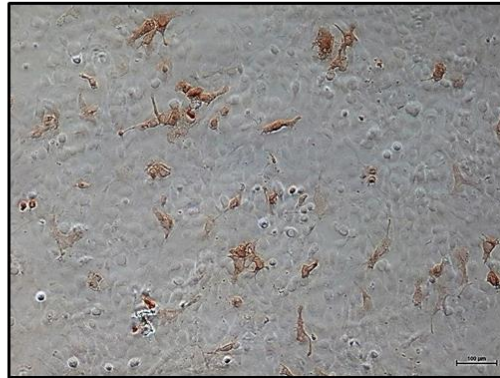
#### **4.1.6 Morphologische Änderungen nach PD-L1-Überexpression radiosensitiver HNSCC-Zelllinien**

Immunzytochemische-Färbungen von PD-L1 mit DAB zeigten nach transienter Überexpression von PD-L1 in radiosensitiven Zelllinien keine einheitliche PD-L1-Expression. Dabei stellte sich heraus, dass PD-L1 nur von ungefähr 10 - 15 % der radiosensitiven Zellen stark überexprimiert wurde. Genau diese Zellen wiesen auch eine veränderte Morphologie auf. Zellen mit stark positiver PD-L1-Expression stellten sich mit länglicher, spindelförmiger Gestalt dar und waren größer. Abbildung 15 zeigt repräsentative Bilder der radiosensitiven HNSCC-Zelllinie PCI 9 mit niedriger PD-L1-Basalexpression nach Plasmid-Transfektion. Als Transfektions-Kontrolle wurden Zellen mit Leervektor transfiziert (CV) und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Diese Zellen zeigten einheitlich die typisch pflastersteinartige Morphologie von Keratinozyten.

**CV (HE-Färbung)**



**PD-L1 (DAB-Färbung)**



**Abbildung 15: Veränderung der Zellmorphologie**

Mikroskopische Aufnahmen der Zelllinie PCI9 in 4-facher Vergrößerung nach Plasmid-Transfektion.

Links: Nach der Transfektion mit Leervektor (CV) wurden die Zellen mit einer HE-Färbung sichtbar gemacht; Balkenmaß: 100 µm;

Rechts: Nach PD-L1-Überexpression (PD-L1) wurden PD-L1-positive Zellen mit einer DAB-Färbung detektiert; Balkenmaß: 100 µm;

PD-L1-positive PCI 9 mit länglicher, spindelförmiger Gestalt neben PD-L1-negativen PCI 9 mit rundlicher kleinerer Gestalt;

#### **4.2 Ermittlung der PD-L1-Membranexpression nach Selektion von Membranproteinen durch Präzipitation mit Biotin**

In den Vorversuchen der AG Bauer zeigte sich, dass sich die Expression von PD-L1 in den untersuchten HNSCC-Zelllinien strahlendosisabhängig verändert. In FACS-Analysen konnte festgestellt werden, dass der PD-L1 Gehalt an der Membran der radioresistenten Zelllinien nach einer Radiatio mit 8 Gy signifikant abgenommen hat, während dagegen in Western Blot-Analysen ein dosisabhängiger Anstieg der PD-L1-Gesamtexpression beobachtet werden konnte. Um die Abnahme der PD-L1-Expression an der Zellmembran der radioresistenten Zellen nach einer Bestrahlung mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen und zu bestätigen, wurde eine Selektionierung der Membranfragmente durchgeführt und die membrangebundenen Proteine auf ihren PD-L1 Gehalt im Western Blot untersucht. Dazu wurde die Membran mit Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert, die Zellen lysiert und die Membranfragmente mithilfe von magnetischen Kügelchen von den restlichen

Zellbestandteilen getrennt. Daraufhin wurde der PD-L1 Gehalt der bestrahlten Zellen durch einen spezifischen Antikörper im Western Blot kenntlich gemacht und mit dem PD-L1 Gehalt der Membran unbestrahlter Zellen verglichen. Um die Probenladung kontrollieren und normalisieren zu können, wurde die Membran mit einer Ponceau-Lösung angefärbt (78)

#### **4.2.1 Etablierung der Selektion von Membranproteinen durch Präzipitation mit Biotin**

Zu Beginn wurde die nötige Zellzahl ermittelt, um nach der Selektion der Zellen durch Sulfo-NHS-SS-Biotin genügend Zellmembranfragmente zur Detektion von Membranproteinen zu erhalten. Dazu wurde eine Anzahl von 500.000 und 5.000.000 Zellen getestet. Die Membranproteine wurden mit jeweils 80 µl Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert und das Volumen der verwendeten Beads zur Präzipitation der markierten Membranfraktion wurde auf die eingesetzte Zellzahl angepasst. Membranproteine aus  $5 \times 10^5$  Zellen wurden mit 20 µl Beads präzipitiert, Membranproteine aus  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 150 µl Beads präzipitiert. Die Abbildung 16 zeigt deutlich, dass ein sichtbares Ergebnis von membranständigem PD-L1 erst ab dem Einsatz einer Zellzahl von mehr als 500.000 Zellen ermöglicht wird. Daher wurde für alle weiteren Experimente eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Probe eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte jeweils mit 150 µl Beads.

Zur Quantifizierung und Verifizierung der Reinheit wurden geeignete „Housekeeper“ der isolierten Membranfraktion bestimmt. Hierfür wurde die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase verwendet. Diese Ionenpumpe ist ein Transmembranprotein und bestätigt damit die Selektion der Membranfraktion mittels des Sulfo-NHS-SS-Biotin und ermöglicht gleichzeitig eine Ladekontrolle der Proben (79). Um die Reinheit der isolierten Membranfraktion zu überprüfen, wurde mit einem Antikörper gegen GAPDH und  $\beta$ -Aktin gegengefärbt. Um zu überprüfen, ob spezifische Fraktionen mit Proteinen anderer Zellfraktionen kontaminiert waren, stellte sich lediglich GAPDH als geeignete Kontaminationskontrolle heraus. (Abbildung 16)



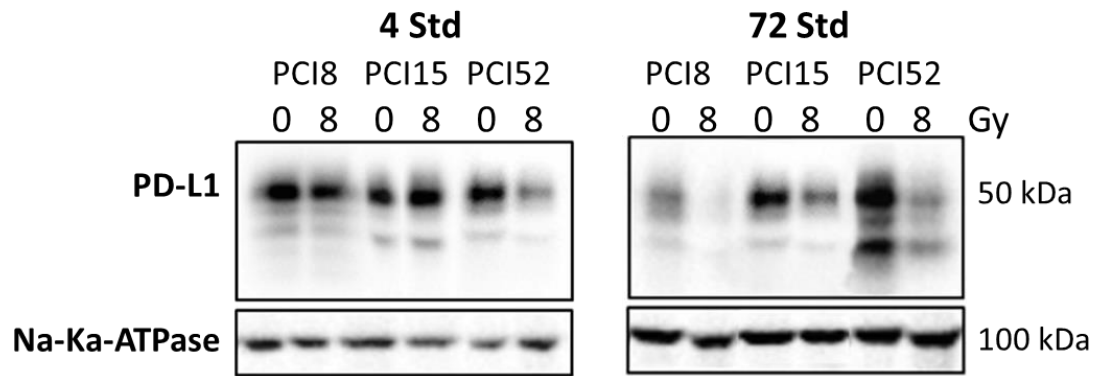


**Abbildung 16: Western Blot-Analyse zur Optimierung der Zellzahl für Sulfo-NHS-SS-Biotin und Test von geeigneten Kontaminationskontrollen**

WB-Analyse zur Optimierung der eingesetzten Zellzahl für die Detektion von Membranproteinen nach Selektionierung mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin. Eingesetzt wurden  $5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^6$  Zellen. Präzipitiert wurde mit 20  $\mu$ l und 150  $\mu$ l Beads. Von 95  $\mu$ l Eluat wurden 30  $\mu$ l im Western Blot eingesetzt. Membranständiges PD-L1 der isolierten Membranfraktion wurde bestimmt. Kontrolle der Reinheit durch Detektion von GAPDH.

#### 4.2.2 Veränderung der PD-L1-Membranexpression in HNSCC-Zelllinien nach Radiatio

Die radioresistenten Zelllinien PCI 8, 15 und 52 mit hoher Basalexpression von PD-L1 an der Membran wurden mit 8 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden 4 Std sowie 72 Std nach Bestrahlung analysiert. Unbestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. 4 Std nach der Radiatio war noch kein signifikanter Unterschied an der Expression von PD-L1 an der Membran zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen erkennbar. Die Ergebnisse 72 Std nach der Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 8 Gy zeigten, dass die PD-L1-Expression an der Membran der radioresistenten Zelllinien deutlich erkennbar abnimmt.



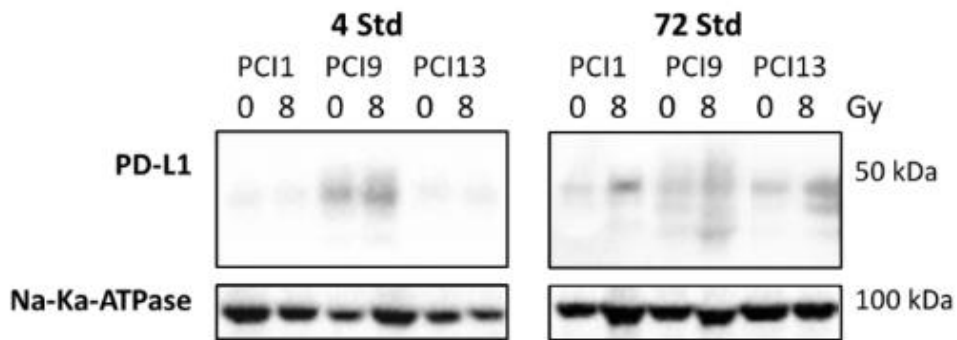
**Abbildung 17: Western Blot-Analyse zur PD-L1 Detektion der Membranfraktion radioresistenter HNSCC-Zelllinien**

Selektionierung von Membranproteinen mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin. Von 95 µl Eluat wurden für die WB-Analyse 30 µl eingesetzt.

Detektiert wurde PD-L1;

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase diente als Ladekontrolle;

Die radiosensitiven Zelllinien PCI 1, 9 und 13 mit einer geringen Basalexpression von PD-L1 an der Membran wurden ebenfalls mit 8 Gy bestrahlt und 44 Std nach der Radiatio kein wesentlicher Unterschied an der Membranexpression von PD-L1 zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse 72 Std nach der Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 8 Gy zeigten ein gegenläufiges Ergebnis zu den radioresistenten Zellen. Hierbei konnte ein Anstieg der PD-L1-Expression an der Membran beobachtet werden



**Abbildung 18: Western Blot-Analyse zur PD-L1 Detektion der Membranfraktion radiosensitiver HNSCC Zelllinien**

Selektionierung von Membranproteinen mittels Sulfo-NHS-SS-Biotin. Von 95 µl Eluat wurden für die WB-Analyse 30 µl eingesetzt.

Detektiert wurde PD-L1;

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase diente als Ladekontrolle;

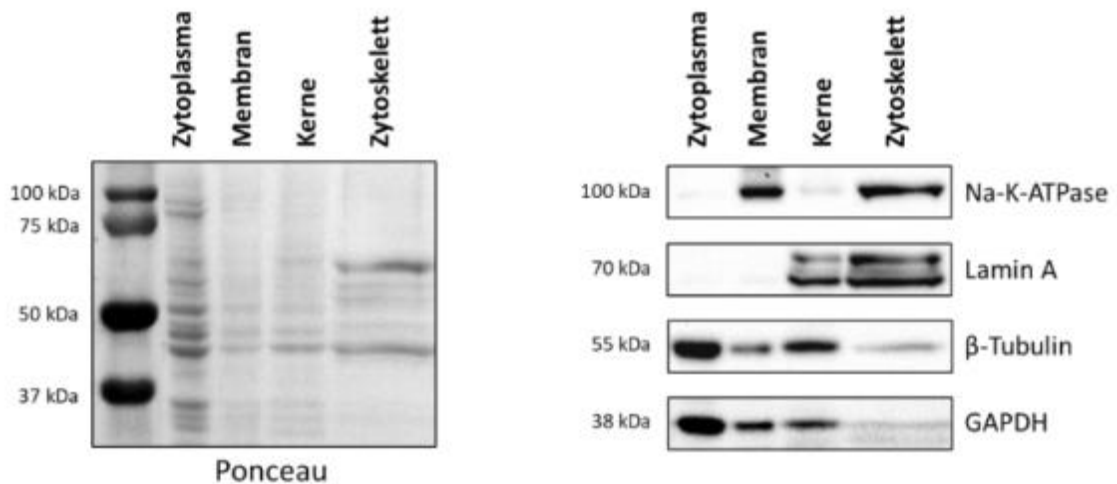
### 4.3 PD-L1 Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten von HNSCC-Zelllinien

Um weiter zu ergründen, ob PD-L1 auch in anderen Zellbestandteilen außer der Membran exprimiert wird, wurden die radiosensitiven und radioresistenten Zelllinien in ihre verschiedenen Zellkompartimente Membran, Zytoplasma, Kern und Zytoskelett aufgetrennt. Es sollte auch überprüft werden, ob und wie sich die PD-L1-Expression nach der Bestrahlung in den jeweiligen Fraktionen ändert. Dafür wurden die Zelllinien mit 8 Gy bestrahlt und 4 Std und 48 Std nach der Bestrahlung mit Hilfe eines Kits (siehe Material und Methoden) aufgetrennt und analysiert. Zur Kontrolle wurden unbestrahlte HNSCC Zelllinien verwendet und gleichermaßen mit dem Kit fraktioniert.

#### 4.3.1 Überprüfung der Reinheit nach Auftrennung verschiedener Zellkompartimente mit dem ProteoExtract Kit

Um die Reinheit der einzelnen Kompartimente zu überprüfen, wurden die isolierten Fraktionen der Zelllinie PCI 52 im Western Blot auf die Expression unterschiedlicher charakteristischer Marker untersucht und in Abbildung 19 dargestellt. Die Membranfraktion exprimiert die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im Vergleich zur Zytoplasma- und

Kernfraktion am stärksten. In der Kernfraktion kann im Vergleich zur Zytoplasma- und Membranfraktion der höchste Proteingehalt an Lamin A gefunden werden. Die Zytoplasmafraktion exprimiert im Vergleich zur Membran- und Kernfraktion GAPDH und  $\beta$ -Tubulin am Stärksten. In der Zytoskelettfraktion konnte eine starke Expression der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Lamin A Expression nachgewiesen werden. Die Expression von  $\beta$ -Tubulin und GAPDH ist vergleichsweise gering.



**Abbildung 19: Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Reinheit isolierter Zellkompartiment-Fractionen**

Hier wurde die Zelllinie PCI 52 verwendet. Proteine der Kern- und Zytoskelettfraktion wurden vor der Analyse mittels ProteoExtract Kit gefällt. Es wurden 30  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt.

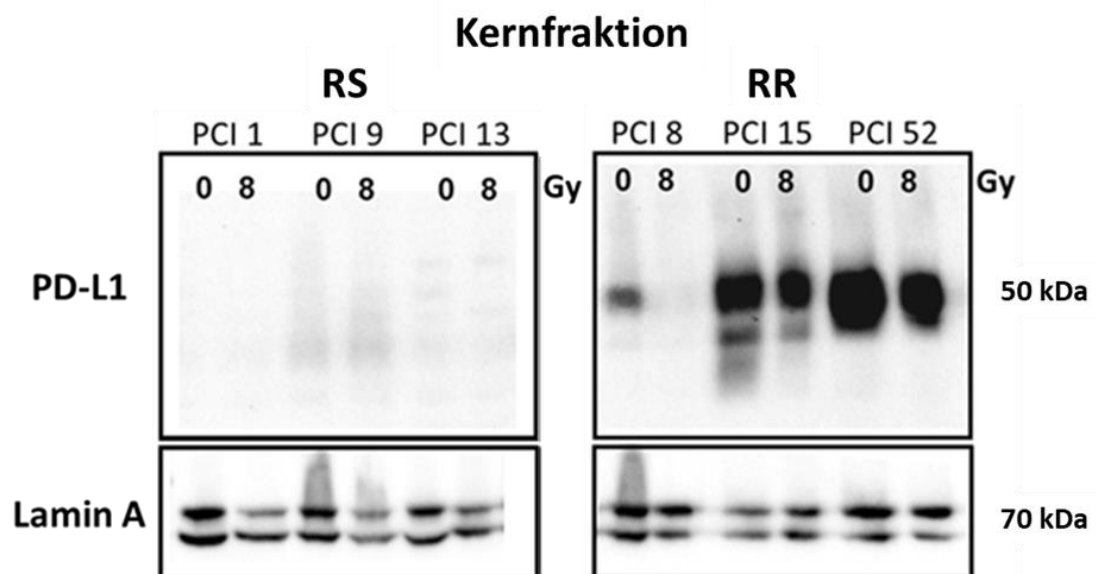
#### 4.3.2 Expression von PD-L1 vor und nach Radiatio im Zellkern und im Zytoplasma

Da bisher noch keine Kenntnisse zur zellinternen Lokalisation von PD-L1 in den untersuchten HNSCC-Zelllinien vorlagen, wurde die Kern- und Zytoplasmafraktion näher analysiert. Es sollte überprüft werden, ob und wie sich die PD-L1-Expression nach der Bestrahlung in den jeweiligen Kompartimenten ändert.

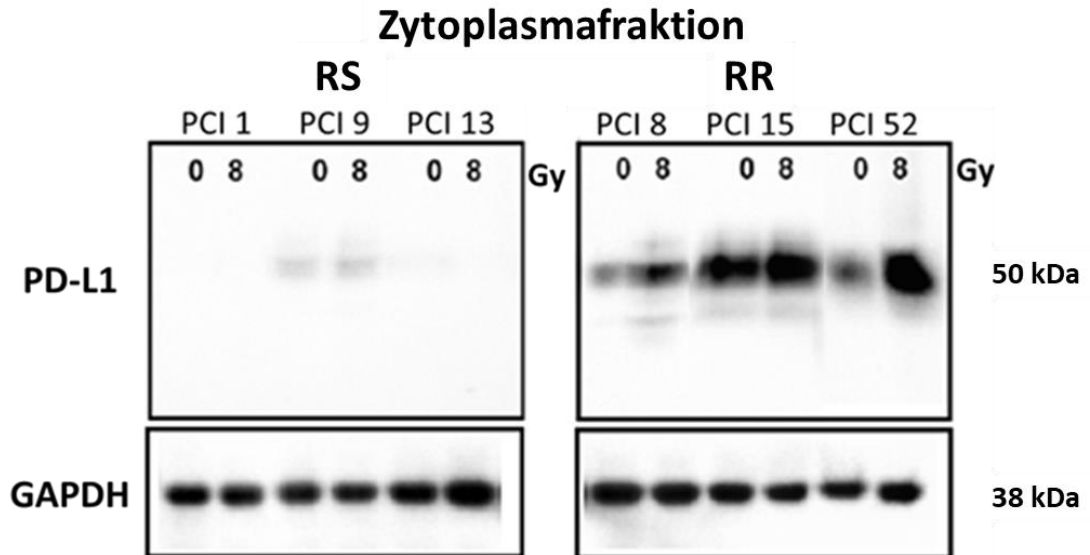
Die Abbildung 20 zeigt die PD-L1-Expression im Nukleus. Zum 4 Std Zeitpunkt nach der Bestrahlung lässt sich bei den radiosensitiven und radioresistenten Zellen kein signifikanter Unterschied beobachten. Nach 48 Std allerdings unterschied sich die PD-L1-Kernexpression von den radioresistenten Zelllinien signifikant von der

PD-L1-Kernexpression der RS Zelllinien. Ausschließlich in RR Zelllinien war eine Detektion von PD-L1 im Nukleus nachweisbar. Bei den radioresistenten Zelllinien allerdings lässt sich nach 48 Std eine Diskrepanz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen ausmachen. Hierbei ist bei den mit 8 Gy bestrahlten radioresistenten Kopf- und Halstumorzelllinien im Zellkern eine deutliche Verminderung des PD-L1 Gehalts im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen am Western Blot zu erkennen. 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

Dieser Effekt zeigt sich umgekehrt zum selben Zeitpunkt im Zytoplasma der Zellen. Hierbei kann man einen Anstieg des PD-L1 Gehalts bei den bestrahlten HNSCC Zellen am Western Blot erfassen.



**Abbildung 20: Western Blot-Analyse des PD-L1 Gehalts in der Kernfraktion RS und RR Zelllinien 48 Std nach Radiatio mit 0 und 8 Gy**  
 Verminderung des PD-L1 Gehalts bei den radioresistenten Zellen im Zellkern 48 Std nach einer Bestrahlung mit 8 Gy;  
 Kontrolle der Zellkernfraktion durch Lamin A;



**Abbildung 21: Western Blot-Analyse des PD-L1 Gehalts in der Zytoplasmafraktion 48 Std nach Radiatio mit 0 und 8 Gy**

Anstieg des PD-L1 Gehalts bei den radioresistenten Zellen im Zytoplasma 72 Std nach einer Bestrahlung mit 8 Gy.

Kontrolle der Zytoplasmafraktion durch GAPDH;

## 5. Diskussion

### 5.1 Vorarbeiten als Grundlage für dieses Projekt

In Vorversuchen der AG Bauer, wurden drei radiosensitive (RS) Kopf-und Halstumor HNSCC-Zelllinien PCI1, PCI 9 und PCI 13, sowie drei radioresistente (RR) HNSCC-Zelllinien PCI 8, PCI 15 und PCI 52 bestimmt. Die radioresistenten Zelllinien überlebten im klonogenen Assay, zeigten eine höhere Vitalität, ein verlängertes Überleben und eine verminderte und verzögerte Apoptoserate nach Radiatio im Vergleich zu den RS Zelllinien auf. (76)

Bei allen Kopf- und Halstumor-Zelllinien konnte PD-L1 auf Gen- und Proteinexpressionsebene nachgewiesen werden. Die PD-L1-Expression der radiosensitiven Zelllinien war sehr gering. Im Vergleich dazu war die PD-L1-Expression der RR Zelllinien signifikant höher. Eine Analyse der PD-L1-Expression nach einer Bestrahlung mit 4 Gy und 8 Gy zeigte in den RR Zelllinien einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der PD-L1-Gesamtexpression. Aus diesem Grund wurde die PD-L1-Expression der radioresistenten Zelllinien mit einer Radioresistenz assoziiert. (76)

Dazu sollte nun näher untersucht werden, ob und in welchen Bereichen der Zelle sich die Lokalisation von PD-L1 nach einer Bestrahlung ändert und ob es Abweichungen zwischen den RR und RS HNSCC-Zelllinien gibt.

Darüber hinaus zeigte eine durchflusszytometrische Analyse nach einer Radiatio eine Verringerung der PD-L1-Expression an der Membran der radioresistenten Zelllinien, welche theoretisch einen schlechteren Therapieerfolg mit Antikörpern zur Blockade der PD-1/PD-L1-Achse zur Folge hätte (76).

Diese Beobachtung sollte in der Arbeit durch eine andere unabhängige Methode bestätigt und dazu ergänzend die Expressionsänderung von PD-L1 in Zytoplasma und Zellkern vor und nach einer Bestrahlung analysiert werden.

Weiterhin konnte in den RR Zelllinien eine Minderung des PD-L1 Gehalts mittels eines siRNA Knockdown herbeigeführt werden. Dies hatte, unabhängig von einer Bestrahlung, eine Verlangsamung der Verdopplungszeit der Zellen zur Folge. (76)

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob PD-L1 den radiosensitiven PD-L1-ärmeren Zelllinien einen direkten Selektionsvorteil gegenüber

der Bestrahlung verschaffen kann. Hierfür wurde die PD-L1-Gesamtexpression der radiosensitiven Zellen durch eine Plasmidtransfektion erhöht und verstärkt.

## **5.2 PD-L1-Expression als Selektionsvorteil bei Bestrahlung**

Um zu testen, ob die PD-L1-Expression das Überleben der Tumorzellen nach einer Bestrahlung begünstigen würde, wurde PD-L1 in den radiosensitiven HNSCC-Zelllinien mit geringer PD-L1-Basalexpression durch Plasmidtransfektion überexprimiert. Um diesen Effekt weiter zu verstärken, wurde die PD-L1-Expression durch eine Inkubation mit IFN  $\gamma$  erhöht. Die Zellen wurden mit 8 Gy bestrahlt, danach die PD-L1-positiven-Zellen mittels immunzytochemischer DAB-Färbung vor und nach Bestrahlung bestimmt und mit den jeweiligen Kontrollen verglichen.

### **5.2.1 Immunzytochemische DAB-Färbung**

Für die DAB-Färbung wurde zunächst die geeignete PD-L1-Antikörper-Konzentration ermittelt, um ein optimales optisches Ergebnis zu erzielen. Hierfür wurde die HNSCC-Zelllinie PCI 52 mit der höchsten PD-L1 Basalexpression verwendet. Eine Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  bewirkte eine höhere Signalstärke als die Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$ . Durch eine Erhöhung der Antikörper-Konzentration konnte keine weitere Steigerung der Signalstärke erreicht werden. Da die Isotyp-Kontrolle bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  keine unspezifischen Bindungen aufwies, wurden für alle weiteren Experimente 3  $\mu\text{g/ml}$  PD-L1-Antikörper eingesetzt.

### **5.2.2 Verstärkte PD-L1-Expression durch Interferon $\gamma$**

Tumorgewebe ist vergleichbar mit einer nicht heilenden Wunde und der damit verbundenen Entzündungsreaktion (80). Im Tumormilieu sind zahlreiche Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine präsent (81). Auch IFN  $\gamma$  ist im lebenden Organismus als proinflammatorisches Zytokin an Entzündungsprozessen beteiligt und in der Tumormikroumgebung zu finden (82). Tumorzelllinien zusätzlich mit IFN  $\gamma$  zu stimulieren kommt dem Tumormilieu in vivo somit etwas näher (82). Zudem sind freigesetzte Interferone, insbesondere IFN  $\gamma$  dafür bekannt, die PD-L1-Expression in Tumorzellen zu regulieren (56). Dabei bindet IFN  $\gamma$  an den



IFN-Rezeptor auf der Zelloberfläche der Krebszellen und führt damit zu einer Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 (77). Diese wiederum fördern die Phosphorylierung der Dimere STAT1 und STAT3, welche im aktivierten Zustand als Transkriptionsfaktoren im Zellkern wirken und an das IRF1-Gen binden (77). Dieses bindet weiterhin an den PD-L1 Promotor und verstärkt die PD-L1-Expression der Krebszelle (77).

### **5.2.3 Schutz vor Interferon-Toxizität durch PD-L1-Expression**

Interessanterweise kann kein signifikanter Unterschied des Anteils PD-L1-positiver Zellen bei unbestrahlten Krebszellen im Kulturmedium mit und ohne INF  $\gamma$  festgestellt werden. Dagegen war bei HNSCCs, die mit 8 Gy bestrahlt wurden, die PD-L1-Expression bei den Zellen im Kulturmedium mit INF  $\gamma$  deutlich stärker als im Medium ohne INF  $\gamma$ . Bei diesen Ergebnissen scheint es so, als würde INF  $\gamma$  der Zelle nach einer Bestrahlung einen Selektionsvorteil durch eine verstärkte PD-L1-Expression bringen und die Zellen damit möglicherweise resistenter machen. So gibt es aktuelle Forschungsergebnisse, die darauf hindeuten, dass PD-L1 die Krebszelle vor der Interferon-Toxizität schützen könnte. Interferone hemmen das Zellwachstum und das Überleben der Tumorzellen, führen zu einer schneller fortschreitenden Zellalterung und können die CASP-abhängige Apoptose der Krebszellen auslösen (83). Das RMLDVEKC-Motiv, welches einen Teil der intrazytoplasmatischen Domäne von PD-L1 darstellt, schützt die Krebszelle vor Interferon-Toxizität, indem sie diese reduziert (83).

### **5.2.4 Erhöhter relativer Anteil PD-L1-positiver Zellen nach Bestrahlung**

Bei der Zelllinie PCI 9 wurde durch eine transiente Plasmid-Transfektion PD-L1 überexprimiert und ein Teil der Zellen daraufhin bestrahlt. Dabei zeigte sich in den Ergebnissen, dass 72 Std nach der Bestrahlung der relative Anteil der PD-L1-positiven Zellen im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kontrollzellen deutlich erhöht war. Dieser Effekt ließ sich sowohl im Kulturmedium ohne INF- $\gamma$ , als auch noch verstärkt im Kulturmedium mit INF- $\gamma$  erkennen. Die RS Zelllinien PCI 1 und 13 zeigten eine ähnliche Tendenzen wie PCI 9.

Der erhöhte relative Anteil PD-L1-positiver Zellen nach der Bestrahlung könnte auf intrinsische Funktionen des Proteins in den Tumorzellen hinweisen.

### **5.2.5 Einfluss von PD-L1 auf die Proliferation**

Da in Vorversuchen ein PD-L1 Knockdown in den HNSCC-Zelllinien mit hoher PD-L1-Basalexpression zu einer Verringerung der Verdopplungszeit führte, könnte man vermuten, dass Krebszellen mit erhöhtem PD-L1 Gehalt stärker und schneller proliferieren als die Zellen mit wenig PD-L1 (56) (84) (55). Wäre dies zutreffend, sollte der Anteil PD-L1-positiver Zellen einerseits auch bei den unbestrahlten Kontrollzellen im Vergleich zwischen dem 4 Std und 72 Std Zeitpunkt deutlich höher sein, und andererseits der Anteil PD-L1-positiver Zellen zum 72 Std Zeitpunkt bei den bestrahlten Zellen im Vergleich nicht deutlich höher als bei den unbestrahlten Zellen.

### **5.2.6 Einfluss von PD-L1 auf die Reparatur von DNA-Schäden nach Radiatio**

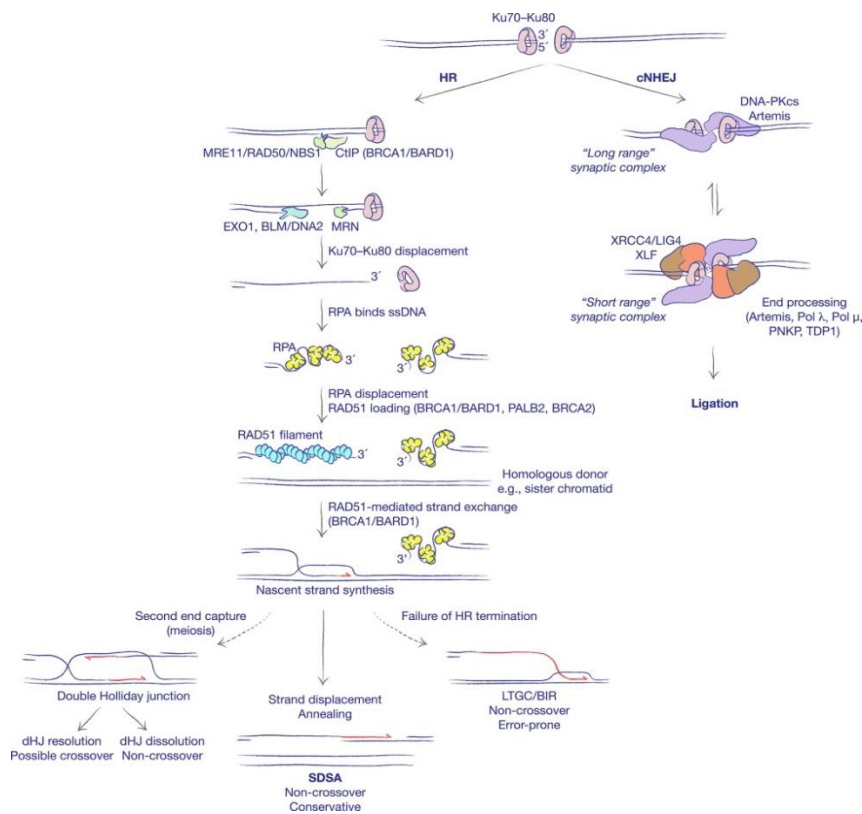
Weiterhin könnten diese Ergebnisse darauf hin deuten, dass PD-L1 den Tumorzellen einen Überlebensvorteil und damit Selektionsvorteil nach Radiatio verschafft.

Eine Bestrahlungstherapie führt direkt oder indirekt über freie Radikale zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA der Zellen (85). Dabei ist auffallend, dass Tumorzellen mit hohem PD-L1 Gehalt deutlich resistenter, Krebszellen mit keiner oder sehr geringer PD-L1-Expression signifikant sensibler gegenüber einer Radiotherapie sind (86). Dies lässt vermuten, dass PD-L1 eine unterstützende Funktion bei der zellulären DNA-Schadensantwort in Tumorzellen haben könnten (86). Regulär gibt es zwei Hauptwege für die Reparatur, eines Doppelstrangbruchs, die bei einer Genom-Schädigung ausgelöst werden (87).

Dazu zählt zum einen die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ), welche während des gesamten Zellzyklus ausgenommen der M-Phase ablaufen kann (88). Dabei bindet das Heterodimer Ku70/80 sehr schnell an die freien Enden der geschädigten DNA-Stränge. Durch dieses Protein werden die DNA-PKcs (DNA-abhängige Proteinkinase), die Nuklease Artemis und Polymerasen aus der Pol X-Familie für die Anlagerung der Nukleotide rekrutiert. Durch den DNA-Ligase-IV-Komplex,

einschließlich der Faktoren XRCC4 und XLF kommt es zu Verknüpfung der einzelnen DNA-Strangenden, die Ligation. (89)

Der zweite Pfad ist die homologe Rekombination, welche nur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus erfolgt (88). Nach der Bindung des Ku70/80-Komplexes an die freien DNA-Enden und Stimulation durch BRCA1, kommt es zur DNA-Endresektion durch die Endonukleaseaktivität des MRN-Komplexes, welcher aus den Enzymen MRE11, RAD50 und NBS1 besteht (87). Aus dieser Resektion resultiert die Verdrängung des Ku-Protein-Komplexes, wobei gleichzeitig Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) (88) an NSB1 bindet und durch Phosphorylierung aktiviert wird (87). Daraufhin folgt eine Erweiterung der begonnenen Resektion durch Exonukleasen um eine ausreichende Länge des DNA-Einzelstranges zu erhalten (87). Das Replikationsprotein-A bindet an diesen, wodurch Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) (88) aktiviert werden, welche darauf wiederum CHK1 phosphorylieren (87). Das Replikationsprotein wird mit Hilfe von Mediatorproteinen durch RAD51 ersetzt und die DNA-Reparatur über weitere Moleküle wie unter anderem BRCA1, BRCA2 und Chk1 reguliert (87).



**Abbildung 22: Schema von der nicht homologen Endverknüpfung (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR)**

Nach Scully, Panday et al., 2019 (87)

Viele Studien weisen daneben darauf hin, dass nach Doppelstrangbrüchen die PD-L1-Expression über verschiedene Wege hochreguliert wird (60). So induziert eine Genomschädigung eine verstärkte Synthese der PD-L1 mRNA durch eine Aktivierung von Chk1 über ATM/ATR (88) oder über einen Anstieg der STAT1 und STAT3 Phosphorylierung und damit einhergehend eine Erhöhung der IRF1-Konzentration (60).

Darüber hinaus ist laut aktuellen Forschungsergebnissen die Konzentration von NBS1 und BRCA1, Doppelstrangbruch-Reparier-Proteine, bei Tumorzellen ohne oder mit nur sehr wenig PD-L1 signifikant vermindert im Vergleich zu PD-L1-positiven Zellen. Dies ist auf die verminderte mRNA-Stabilität der DNA-Reparatur-Faktoren zurückzuführen und nicht auf eine verminderte Transkription. Intrazelluläres PD-L1 fungiert als mRNA-Bindeprotein, indem die Aminosäuren 270-279 der Zytoplasmadomäne von PD-L1 mit dem GVAGAW-Motiv der mRNA von NBS1 und BRCA1 interagieren. Dies hat zur Folge, dass die mRNAs vor einem Abbau geschützt werden und damit die DNA-Reparatur der Zelle gefördert und verstärkt wird. Dabei ist möglicherweise der Multiproteinkomplex Exosom, welcher beim Abbau von RNA in der Zelle eine wichtige enzymatische Aufgabe erfüllt, von großer Bedeutung. Es scheint dabei als würde PD-L1 mit derselben Bindestelle der RNAs, dem GVAGAW-Motiv, interagieren wie die katalytischen Komponenten EXOSC4 und EXOSC10 des Exosoms, wodurch dieses nicht an die RNAs binden kann und damit seine katalytische Funktion nicht erfüllen kann. (86)

### **5.2.7 Differenzielle Zellmorphologie und veränderte Zellmotilität durch PD-L1**

Auffallend an den durch DAB-Färbung kenntlich gemachten PD-L1-positiven Zellen ist, dass sie sich durch ihre Morphologie von den anderen Tumorzellen unterscheiden. Dabei ist erkennbar, dass stark PD-L1-positive-Zellen ihre pflastersteinartige, kleine, runde Morphologie, welche typisch für Epithelzellen ist, verloren haben. Stattdessen stellen sich die PD-L1-überexprimierenden Zellen größer dar und zeigen eine spindelförmige Form auf, welche an Zellen mit mesenchymalem Charakter erinnert (90) (91). Die Transfektionskontrolle mit anschließender HE-Färbung, wies keinerlei solcher morphologischer Veränderungen

auf. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die morphologischen Veränderungen alleine aus der PD-L1 Überexpression resultieren.

Im Allgemeinen besteht ein Tumor aus heterogenen Zellpopulationen, welche funktionelle, morphologische und genetische Unterschiede aufweisen (92) (90). Krebsstammzellen sind ein Teil davon und besitzen die Fähigkeit zur Tumorgenese, Differenzierung und Selbsterneuerung, zum anderen sind sie häufig resistent gegen Therapien und können Rezidive hervorrufen (90) (92). Beim oralen Plattenepithelkarzinom entsprechen Zellen mit Markern, wie dem Oberflächen-Glykoprotein-Rezeptor CD44 (93), dem Transmembranglykoprotein CD133, dem Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) und dem ATP-bindenden Kassettentransporter (ABC) dieser Tumorstammzell-Untergruppe (90). Studien zeigen, dass es verschiedene Faktoren gibt, die zur Entstehung von Krebsstammzellen durch eine epithelial mesenchymale Transition (EMT) der Tumorzellen führen können. Dieser Übergang ist ein besonderes Auftreten von der Umwandlung von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen (94), welcher regulär eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung und der Gewebeentwicklung spielt (90). Auf die EMT bei Krebszellen haben Hypoxie, Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) (90) und epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) einen großen Einfluss (95). Bei Kopf- und Halstumorzellen wird häufig der Transkriptionsfaktor Gliom-assoziiertes-Onkogen Homolog 1 (Gli1) aktiviert, welches über den Sonic-Hedgehog-Signalweg (SHH) der Transition von epithelialen zu mesenchymalen Krebszellen beteiligt ist (90). Weiterhin zeigen Studien, dass die PD-L1-Expression der Tumorzellen signifikant mit der Umwandlung der Zellen im Zusammenhang steht (57) (96). Dabei scheint, dass PD-L1 durch die Zytoplasmadomäne vermittelt die Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert, welche wiederum an die Serin-/Threonin-Kinasen Akt1 und Akt2 bindet und diese ebenfalls aktiviert (91) (94). Daraus resultiert, dass in den Tumorzellen die EMT gefördert wird und damit verbunden die Eigenschaften und Funktionen des mesenchymalen Phänotyps verstärkt werden (57) (92) (97).

Des Weiteren werden PD-L1-positive Krebszellen mit häufiger Metastasierung des Tumors in Verbindung gebracht (56). Dies lässt sich durch die EMT der Tumorzellen und den damit verbundenen Verlust epithelialer Merkmale wie den Zell-Zell-Verbindungen und die erhöhte Invasionsfähigkeit mesenchymaler Zellen erklären (90). Durch diese Umwandlung ist es für die entarteten Zellen möglich die

Basalmembran zu durchdringen, dadurch in andere Bereiche den Körpers zu gelangen und dort Metastasen zu bilden (90).

Durch diesen Übergang und die Veränderung der Zellen werden die Eigenschaften zur Selbsterneuerung der Tumorzellen, die Tumorentstehung und eine Therapieresistenz gefördert, was ein vermehrtes Überleben PD-L1-positiver Zellen erklären könnte und damit den erhöhten relativen Anteil nach der Bestrahlung.

### **5.3 Lokalisation von PD-L1 nach Radiatio**

Um nachzuweisen wie sich die PD-L1-Expression nach einer Bestrahlung verhält und in welchen Bestandteilen der Zellen sich der PD-L1 Gehalt verändert, wurde PD-L1 durch einen spezifischen Antikörper in den einzelnen Fraktionen der Tumorzellen kenntlich gemacht.

#### **5.3.1 Expression von PD-L1 an der Zellmembran**

In Vorarbeiten zeigten durchflusszytometrische Analysen nach einer Bestrahlung mit 8 Gy eine Verringerung der PD-L1-Membranexpression in RR Zelllinien und eine Zunahme der Membranexpression in RS-Zelllinien (76). Um diese Veränderungen der PD-L1-Expression mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden die Membranfraktionen der HNSCC-Zelllinien auf ihren PD-L1 Gehalt nach einer Bestrahlung mit 8 Gy im Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die PD-L1-Expression bei radioresistenten Zellen nach einer Bestrahlung an der Membran anstieg. Bei radiosensitiven Zelllinien wurde ein gegenläufiges Ergebnis beobachtet. Diese Ergebnisse konnten somit die Beobachtungen der FACS-Analyse verifizieren. Weiterhin stellte sich dar, dass in den radioresistenten Zelllinien der PD-L1 Gehalt im Zellkern nach einer Bestrahlung verringert, im Zytoplasma dagegen erhöht war.

#### **5.3.2 Veränderte PD-L1-Expression der Tumorzellen nach der Bestrahlung auf der Zellmembran**

Die Bestrahlung der Tumorzellen ist eine der wichtigsten nicht operativen Behandlungsmethoden des Kopf- und Halsplatteneithelkarzinoms (98). Dabei werden einerseits DNA-Schäden in den Krebszellen induziert (88), andererseits wird

eine antitumorale Immunantwort erzeugt (98). Viele Studien zeigen, dass die PD-L1-Expression von Tumorzellen nach einer Radiatio signifikant erhöht ist (60) (88) (99). Hierbei wird das Expressionsmaximum bei vielen Krebsarten 72 Std nach der Strahlenbehandlung erreicht (98) und der erhöhte PD-L1 Gehalt korreliert mit einem verschlechterten Gesamtüberleben der Patienten/-innen (100). Da die PD-L1-Expression auf den Krebszellen durch verschiedene Zytokine moduliert werden kann (98), hat die durch die Strahlentherapie veränderte Mikroumgebung des Tumorgewebes eine wichtige Bedeutung (101).

Die Radiatio bewirkt eine Erhöhung der Protein- und Peptidsynthese innerhalb der Tumorzellen (101). Dies führt dazu, dass die Bildung von MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse-1-Peptidkomplexen hochreguliert wird und damit zugleich die Antigenpräsentation an der Oberfläche der Krebszellen (101). Diese MHC-Komplexe werden von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt, die daraufhin verstärkt IFN  $\gamma$  und Interleukin-6 (IL-6) freisetzen (98) (102). Diese Zytokine führen dann über den JAK/STAT-Signalweg, welcher genauer in Punkt 5.2.2 erklärt ist, eine verstärkte PD-L1-Expression herbei (101).

Weiterhin induziert die Strahlentherapie eine Immunaktivierung über den cGAS-STING-Signalweg (96) (97) (98) (99) (100) (101). cGAS ist ein Nukleinsäure-Sensor, der eine zytoplasmatische DNA, welche aufgrund einer DNA-Schädigung während der Mitose der Tumorzellen gebildet wird, erkennt und aktiviert daraufhin die cGAMP-Synthese. cGAMP bindet an das Adapterprotein STING und aktiviert dieses dadurch. Daraufhin wird die Produktion von Typ-1-Interferonen induziert, welchen eine tumorschrumpfende Wirkung zugesprochen wird. Zudem haben diese Interferone ebenfalls eine verstärkte PD-L1-Expression zur Folge. Im Vergleich zu den Typ-2-Interferonen, insbesondere dem IFN  $\gamma$ , wirken die Typ-2-Interferone zwar schwächer, sind aber dennoch am erhöhten PD-L1 Gehalt mitbeteiligt. (101)

Da unsere Versuche allerdings ohne Immunzellen durchgeführt wurden und damit eine erhöhte PD-L1-Expression der radioresistenten Zellen nach der Bestrahlung durch eine Immunaktivierung ausgeschlossen werden kann, muss diese Reaktion noch durch andere Gründe erklärbar sein.

Ein Grund hierfür könnten von den Tumorzellen freigesetzte Exosomen sein. Exosomen sind 30 – 150 Nanometer (nm) große extrazelluläre Vesikel mit einer Lipiddoppelschicht (103) (104) (105). Sie entstehen aus Endosomen, welche durch eine nach innen gerichtete Knospung ihrer Membran zu multivesikulären Körpern

(MVK) werden (106). Durch darauffolgende Fusion der MVKs mit der Plasmamembran der Zelle, werden sie als Exosomen in den Extrazellularraum abgegeben (106). Sie können verschiedene Proteine, Lipide und Nukleinsäuren wie DNA, mRNA und mikroRNA enthalten und auf diesem Weg mit der Empfängerzelle kommunizieren, Signalwege aktivieren und diese dadurch beeinflussen (103) (104) (107). Dabei können die Exosomen entweder mit einem Rezeptor auf der Zielzelle interagieren oder werden von dieser internalisiert (107). In aktuellen Forschungsergebnissen wird gezeigt, dass im Bereich von Kopf- und Halstumorzellen Exosomen nachgewiesen werden konnten (108), welche sowohl auf ihrer Oberfläche PD-L1 exprimierten als auch im Inneren der Vesikel PD-L1 beinhalteten (103) (108). Die Proteine der Rab-Familie spielen hier bei der Vermittlung der Endozytose, der Biogenese und dem Transport der Exosomen eine wichtige Rolle (103) (105). Das exosomale PD-L1 weist dabei dieselbe Topologie wie die PD-L1 der Tumorzellen auf (103). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die exosomale PD-L1 auf die Empfängerzelle übertragen werden und ihre Funktion erfüllen kann (103). Zellulärer Stress kann die Menge der Exosomensekretion, wie auch deren Inhalt und damit verbunden die Auswirkung auf die Empfängerzelle stark verändern (104) (107). Einer der wichtigsten Auslöser einer zellulären Stressreaktion in der Krebsbehandlung ist die Radiotherapie mit ionisierender Strahlung. Studien belegen, dass eine Radiatio der Krebszellen eine Veränderung der Exosomenzusammensetzung zur Folge hat und der Inhalt deutlich onkogener als bei nicht bestrahlten Zellen war (104). Dies könnte erklären, weshalb nach der Bestrahlung der Kopf- und Halstumorzellen mit 8 Gy der PD-L1 Gehalt auf der Zellmembran signifikant erhöht war.

### **5.3.3 PD-L1-Expression in unterschiedlichen Zellkompartimenten der HNSCC-Zelllinien**

#### **5.3.3.1 Fraktionierung der einzelnen Zellkompartimente mittels ProteoExtract Kit**

Um den PD-L1 Gehalt der einzelnen Zellbestandteile zu überprüfen, wurden die Zellen mit Hilfe eines Kits (siehe Material und Methoden) aufgetrennt. Um die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu analysieren und dadurch die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden diese mit geeigneten „Housekeepern“ untersucht.



Dabei zeigte sich, dass sich vor allem in der Zytoskelettfraktion eine große Menge der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, welche als membranständiges Transportprotein bekannt ist, und des Lamin A, welches als Protein des Zellkerns beschrieben wird, nachgewiesen werden konnte. Weiterhin ist auffallend, dass in der Zytoplasmafraktion viel und in der Zytoskelettfraktion dagegen kaum  $\beta$ -Tubulin detektiert wurde, welches als Hauptbestandteil des Zytoskeletts gilt. Da dies darauf schließen lässt, dass sich in der Zytoskelettfraktion viele andere Zellkompartimente befinden, wurde diese Fraktion bei dem Nachweis von PD-L1 nicht beachtet. Zudem fanden wir das Enzym GAPDH vor allem im Zytosol, allerdings auch in geringeren Mengen im Kern- und Membrankompartiment. So kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass die nachfolgende PD-L1 Detektion die Tendenz der Verteilung in den einzelnen Zellbestandteilen zeigt, wobei es bei den Auftrennungskits trotz Etablierung eine Limitation gibt und deswegen eine leichte Verunreinigung der Fraktionen vorliegen kann.

### **5.3.3.2 PD-L1-Expression in Zytoplasma- und Kernkompartiment bei bestrahlten und unbestrahlten HNSCC-Zelllinien**

PD-L1 ist ein Transmembranprotein, welches eine Immunreaktion des Körpers unterdrückt und damit einen Angriff des Immunsystems auf die Krebszellen hemmt (45). Allerdings legen immer mehr Studiendaten auch intrinsische Funktionen von PD-L1 dar (56). Aus diesem Grund wurden die Kopf- und Halstumorzellen in einzelne Zellbestandteile aufgeteilt und der PD-L1 Gehalt der jeweiligen Zellfraktionen vor und nach einer Bestrahlung der Zellen ermittelt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das Protein nicht nur auf der Membran der Tumorzellen, sondern auch in der Zytoplasmafraktion und in der Zellkernfraktion vorkommt. Weiterhin zeigte sich, dass in den radioresistenten Zelllinien der PD-L1 Gehalt im Zellkern nach einer Bestrahlung verringert, im Zytoplasma dagegen erhöht war. Allerdings sollte beachtet werden, dass das detektierte PD-L1 nicht zwingend im Zellkern vorhanden sein muss. So kann sich PD-L1 auch außen auf der Kernhülle befinden. Weiterhin ist es möglich, dass Zellstrukturen, welche mit dem Zellkern verbunden sind, wie beispielsweise das endoplasmatische Retikulum, durch den ProteoExtract Kit nicht vollständig vom Zellkern abgetrennt wurden. Dadurch könnte auch die vermehrte Detektion von  $\beta$ -Tubulin in der Kernfraktion erklärbar sein. Auch anderen Krebsarten

wie Brustkrebs, Speiseröhrenkrebs und Eierstockkrebs weisen eine PD-L1-Expression auf der Membran, im Zytoplasma und im Zellkern auf (86) (109) (110) (111) (112). Dabei scheint die membranöse PD-L1-Expression unabhängig von der zytoplasmatischen PD-L1-Expression zu sein (111). Allerdings gibt es Hinweise, dass eine Therapie gegen die Krebszellen Einfluss auf den intrazellulären PD-L1 Gehalt hat. So führte eine chemotherapeutische Behandlung von Brustkrebs zu einer Hochregulation der nukleären PD-L1-Expression und damit verbunden zur Vermittlung einer Resistenz gegen die Medikamente und einer schlechteren Gesamtüberlebensrate der Patienten/-innen (109) (113) (114). Weiterhin zeigte sich bei Speiseröhrenkrebszellen eine schlechtere Gesamtüberlebensrate und Prognose bei einer erhöhten zytoplasmatischen Expression von PD-L1 (112). Diese Daten korrelieren mit unseren Ergebnissen, da nur bei den radioresistenten Tumorzellen ein signifikanter Anstieg des PD-L1 Gehalts im Zytoplasma nach einer Radiatio erkennbar war. Da sich dieses Phänomen dagegen nicht bei den radiosensitiven Zellen abzeichnet, scheint intrazelluläres PD-L1 intrinsische Funktionen zu erfüllen und den Tumorzellen damit einen entscheidenden Überlebensvorteil zu schaffen. Wie in Punkt 5.2.6 genauer beschrieben, kann PD-L1 als mRNA Bindeprotein von wichtigen DNA-Reparaturfaktoren wirken (86). Dies könnte ein möglicher Aspekt sein, den Anstieg der zytoplasmatischen PD-L1-Expression und damit verbunden ein erhöhtes Überleben der radioresistenten Tumorzellen zu erklären.

## 6. Zusammenfassung

Tumoren im Kopf- und Halsbereich stellten mit über 630.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit ein zentrales Thema in der Forschung dar. Trotz einer Vielzahl an Behandlungsmöglichkeiten wie ein chirurgischer Eingriff, Chemo-, Strahlen- oder eine Immuntherapie, konnte die Überlebensrate in den letzten Jahren nicht signifikant verbessert werden. Fraglich ist, weshalb die Heterogenität beim Ansprechen auf die Therapien so groß ist, die entarteten Zellen Behandlungen überleben können und bei bis zu 30 % der Patienten/-innen eine Hyperprogression auftritt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchen Bestandteilen der radioresistenten und radiosensitiven Kopf- und Halstumorzelllinien der Programmed-Death-Ligand 1 vor und nach einer Bestrahlung vorkommt und ob dieser intrinsische Funktionen in den Tumorzellen erfüllen könnten.

Dabei zeigte sich eine PD-L1-Expression auf der Membran aller Zelllinien. Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy, konnte bei den radiosensitiven Krebszellen eine Zunahme der PD-L1-Expression auf der Zelloberfläche, bei den radioresistenten Zellen gegenläufig eine Abnahme der PD-L1-Expression an der Membran nachgewiesen werden. Gleichzeitig führte eine Radiatio zu einem Anstieg des zytoplasmatischen PD-L1 Gehalts und einem Abfall der nukleären PD-L1-Expression in radioresistenten Kopf- und Halstumorzelllinien. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der relative Anteil PD-L1-positiver Zellen nach einer Bestrahlung deutlich höher war als bei den unbestrahlten Kontrollzellen. Daneben wiesen die PD-L1-positiven Zellen eine veränderte Morphologie, welche sich durch eine vergrößerte und spindelförmige Gestalt der Krebszellen darstellte, auf.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass intrazelluläres PD-L1 intrinsische Funktionen erfüllen könnte, welche den Tumorzellen einen bedeutenden Überlebensvorteil schaffen und eine Resistenz gegen Therapien vermitteln könnten. Aus diesem Grund sollten neue Therapieansätze verfolgt werden, welche zielgerichtet neben dem extrazellulären auch das intrazelluläre PD-L1 der Tumorzellen inhibieren sollten. Dadurch soll versucht werden, die intrinsischen Funktionen zu hemmen und bessere Behandlungserfolge zu erzielen.

## 7. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Struktur von PD-1 und PD-L1.....  | 16 |
| Abbildung 2: Beschriftung der 6-Well-Platte bei der PD-L1 Überexpression ....  | 44 |
| Abbildung 3: Kennzeichnung der Objektträger .....  | 46 |
| Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Transfektion bis zur Fixierung.....   | 47 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des Sulfo-NHS-SS-Biotin-Versuchs ..  | 52 |
| Abbildung 6: Nachweisreaktionen beim BCA-Assay.....  | 55 |
| Abbildung 7: Reihenfolge der einzelnen Komponenten vor dem Proteintransfer<br>.....  | 58 |
| Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme in 10-facher Vergrößerung zur<br>Bestimmung der optimalen PD-L1-Antikörper-Konzentration<br>.....          | 62 |
| Abbildung 9: Western Blot zur Bestimmung der PD-L1-Expression nach<br>Inkubation mit 15 ng/ml IFN $\gamma$ .....                                     | 63 |
| Abbildung 10: Western Blot zur Bestimmung der Transfektions-Effizienz.....   | 64 |
| Abbildung 11: DAB- und DAPI-Färbung nach PD-L1 Überexpression der PCI 9<br>.....   | 65 |
| Abbildung 12: Relativer Anteil PD-L1-positiver PCI 9 im Kulturmedium mit IFN $\gamma$<br>.....   | 66 |
| Abbildung 13: Auswirkungen von IFN $\gamma$ auf den PD-L1 Gehalt .....   | 67 |
| Abbildung 14: Auswirkungen der Bestrahlung mit 8 Gy auf den PD-L1 Gehalt<br>der Zelllinie im Kulturmedium ohne und mit IFN $\gamma$ .....            | 68 |
| Abbildung 15: Veränderung der Zellmorphologie.....   | 69 |
| Abbildung 16: Western Blot-Analyse zur Optimierung der Zellzahl für<br>Sulfo-NHS-SS-Biotin und Test von geeigneten<br>Kontaminationskontrollen ..... | 71 |
| Abbildung 17: Western Blot-Analyse zur PD-L1 Detektion der Membranfraktion<br>radioresistenter HNSCC-Zelllinien .....                                | 72 |
| Abbildung 18: Western Blot-Analyse zur PD-L1 Detektion der Membranfraktion<br>radiosensitiver HNSCC Zelllinien.....                                  | 73 |
| Abbildung 19: Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Reinheit isolierter<br>Zellkompartiment-Fractionen .....                                      | 74 |
| Abbildung 20: Western Blot-Analyse des PD-L1 Gehalts in der Kernfraktion RS  |    |

|   |           |
|---|-----------|
| und RR Zelllinien 48 Std nach Radiatio mit 0 und 8 Gy .....   | 75        |
| <b>Abbildung 21: Western Blot-Analyse des PD-L1 Gehalts in der<br/>Zytoplasmafraktion 48 Std nach Radiatio mit 0 und 8 Gy .....</b> | <b>76</b> |
| <b>Abbildung 22: Schema von der nicht homologen Endverknüpfung (NHEJ) und<br/>der homologen Rekombination (HR) .....</b>            | <b>81</b> |

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Abb.</b>             | Abbildung  |
| <b>ABC</b>              | ATP-bindender Kassettentransporter                     |
| <b>AK</b>               | Antikörper   |
| <b>ALDH</b>             | Aldehyd-Dehydrogenase                                  |
| <b>APS</b>              | Ammoniumpersulfat                                      |
| <b>ATM</b>              | Ataxia Telangiectasia Mutated                          |
| <b>ATP</b>              | Adenosintriphosphat                                    |
| <b>ATR</b>              | Ataxia telangiectasia and Rad3 related                 |
| <b>BCA</b>              | Bicinchoninsäure                                       |
| <b>BRCA1/2</b>          | Breast Cancer Gene 1/2                                 |
| <b>BSA</b>              | Bovine Serum Albumin                                   |
| <b>BTLA</b>             | B and T lymphocyte associated                          |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Calciumchlorid   |
| <b>CASP</b>             | cysteinyl-aspartate specific protease                  |
| <b>CD</b>               | Cluster of Differentiation                             |
| <b>Cdc25A</b>           | Cell division cycle 25 A                               |
| <b>CDKN2</b>            | Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A                   |
| <b>CFR-1</b>            | Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1      |
| <b>cGAMP</b>            | Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate |
| <b>cGAS</b>             | Cyclic GMP-AMP synthase                                |
| <b>Chk1</b>             | Checkpoint kinase 1                                    |
| <b>CTLA-4</b>           | Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4            |
| <b>CuSO<sub>4</sub></b> | Kupfersulfat   |
| <b>CV</b>               | Control Vector   |
| <b>DAB</b>              | 3,3'-Diaminobenzidin                                   |
| <b>DAPI</b>             | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                            |
| <b>DMEM</b>             | Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium                  |
| <b>DNA</b>              | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| <b>DNA-PKcs</b>         | DNA-dependent protein kinase                           |
| <b>EDTA</b>             | Ethylendiamintetraacetat                               |
| <b>EGF</b>              | Epithelialer Wachstumsfaktor                           |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>EGFR</b>                       | EGF-Rezeptor                                       |
| <b>EMA</b>                        | Europäischen Arzneimittelagentur                   |
| <b>EMT</b>                        | Epitheliale-mesenchymale Transition                |
| <b>FACS</b>                       | fluorescence-activated cell sorting                |
| <b>FBS</b>                        | Fetal bovine serum = fötales Rinderserum           |
| <b>FDA</b>                        | Food and Drug Administration                       |
| <b>FGF</b>                        | Fibroblast growth factor                           |
| <b>GAPDH</b>                      | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase           |
| <b>GITR</b>                       | glucocorticoid-induced TNFR family related gene    |
| <b>Gli1</b>                       | Gliom-assoziiertes-Onkogen Homolog 1               |
| <b>Gy</b>                         | Gray   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Wasserstoffperoxid                                 |
| <b>HCl</b>                        | Salzsäure  |
| <b>HIV</b>                        | Humanes Immundefizienz-Virus                       |
| <b>HNSCC</b>                      | Head and Neck Squamous Cell Carcinoma              |
| <b>HPV</b>                        | Humanes Papillomvirus                              |
| <b>HRP</b>                        | Horseradish Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase    |
| <b>ICOS</b>                       | Inducible T-cell COStimulator                      |
| <b>IFN <math>\gamma</math></b>    | Interferon $\gamma$                                |
| <b>IgG/IgM</b>                    | Immunglobulin G/M                                  |
| <b>IL</b>                         | Interleukin  |
| <b>IRF1</b>                       | Interferon Regulatory Factor 1                     |
| <b>ISO</b>                        | Isotyp-Kontrolle                                   |
| <b>ITIM</b>                       | Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Inhibitionsmotiv |
| <b>ITSM</b>                       | Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Schaltmotiv      |
| <b>JAK1/2</b>                     | Janus kinase 1/2                                   |
| <b>kDa</b>                        | Kilodalton   |
| <b>LAG-3</b>                      | Lymphocyte-activation gene 3                       |
| <b>MAPK</b>                       | Mitogen-aktivierten Proteinkinase                  |
| <b>MDM2</b>                       | Mouse double minute 2 homolog                      |
| <b>MeOH</b>                       | Methanol   |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Magnesiumchlorid  |
| <b>MHC</b>              | Major histocompatibility complex                                |
| <b>M-Phase</b>          | Mitose-Phase  |
| <b>MRE11</b>            | Meiotic Recombination 11  |
| <b>mRNA</b>             | Messenger RNA   |
| <b>MRN-Komplex</b>      | MRE11-RAD50-NBS1-Komplex  |
| <b>mTOR</b>             | Mammalian target of rapamycin                                   |
| <b>mTORc 1/2</b>        | mTOR-Komplex 1/2  |
| <b>NaCl</b>             | Natriumchlorid  |
| <b>NGS</b>              | Normal Goat Serum   |
| <b>NHEJ</b>             | Non-homologous end joining                                      |
| <b>PAGE</b>             | Polyacrylamidgelelektrophorese                                  |
| <b>PBS</b>              | Phosphate buffered saline                                       |
| <b>PBST</b>             | Phosphat Buffered Saline with Tween                             |
| <b>PCI</b>              | Pittsburgh Cancer Institute                                     |
| <b>PD-1</b>             | Programmed death 1  |
| <b>PD-L1/2</b>          | Programmed death Ligand 1/2                                     |
| <b>PFS</b>              | Paraformaldehyd   |
| <b>pRB</b>              | Retinoblastom-Protein   |
| <b>PTEN</b>             | Phosphatase and Tensin homolog                                  |
| <b>PVDF-Membran</b>     | Polyvinylidenfluorid-Membran                                    |
| <b>Ras-Familie</b>      | Ras-related in brain-Familie                                    |
| <b>RCF</b>              | relative centrifugal force = relative Zentrifugalbeschleunigung |
| <b>RIPA</b>             | Radioimmunoprecipitation Assay                                  |
| <b>RNA</b>              | ribonucleic acid  |
| <b>RPM</b>              | revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute                 |
| <b>RR</b>               | Radioresistente   |
| <b>RS</b>               | Radiosensitive  |
| <b>RT</b>               | Raumtemperatur  |
| <b>SD</b>               | Standardabweichung  |
| <b>SDS</b>              | Sodiumdodecylsulfat = Natriumlaurylsulfat                       |
| <b>SHH</b>              | Sonic-Hedgehog-Signalweg  |
| <b>SHP-1/2</b>          | Protein Src homology region 2 domain-containing phosphatase     |



|                |  |
|----------------|--|
|                | 1/2  |
| <b>siRNA</b>   | Small interfering RNA                                |
| <b>S-Phase</b> | Synthese-Phase                                       |
| <b>STAT1/3</b> | Signal transducer and activator of transcription 1/2 |
| <b>STING</b>   | Stimulator of Interferon Genes                       |
| <b>TBS</b>     | Tris buffered saline                                 |
| <b>TBST</b>    | Tris-buffered saline with Tween20                    |
| <b>TCR</b>     | T-Zell-Rezeptor                                      |
| <b>TEMED</b>   | N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin                  |
| <b>TIM-3</b>   | Triosephosphate isomerase 3                          |
| <b>TNF</b>     | Tumornekrosefaktor                                   |
| <b>Tris</b>    | Tris(hydroxymethyl)- aminomethan                     |
| <b>WB</b>      | Western Blot   |
| <b>XLF</b>     | XRCC4-like factor                                    |
| <b>XRCC4</b>   | X-ray repair cross-complementing protein 4           |

## 9. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien .....   | 26 |
| Tabelle 2: Verwendete Kits .....  | 27 |
| Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Lösungen .....   | 27 |
| Tabelle 4: Verwendete Materialien .....   | 31 |
| Tabelle 5: Verwendete Geräte .....  | 32 |
| Tabelle 6: Trypsin-EDTA, 1x, 50 ml .....  | 34 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung des Lysepuffers, 10 ml .....   | 34 |
| Tabelle 8: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers, 10 ml .....  | 35 |
| Tabelle 9: Zusammensetzung des BCA-Reagenzes .....  | 35 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers, 5x .....  | 36 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung des 10%igen Acrylamid-Trenngels, 1,5 mm dick<br>.....   | 36 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung des 4%igen Acrylamid-Sammelgels, 1,5 mm<br>dick.....  | 36 |
| Tabelle 13: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Elektrodenpuffers, 10x .....   | 37 |
| Tabelle 14: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Elektrodenpuffers, 1x, 1 L .....   | 37 |
| Tabelle 15: Zusammensetzung des Blotpuffers, 10x .....  | 37 |
| Tabelle 16: Zusammensetzung des Blotpuffers, 1x, 1 L .....  | 38 |
| Tabelle 17: Zusammensetzung TBS, 10x, pH 7,5 .....  | 38 |
| Tabelle 18: Zusammensetzung TBST, 1x, 1 L .....   | 38 |
| Tabelle 19: Verwendete Primärantikörper zum Nachweis von PD-L1, Lamin A/C,<br>Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase, GAPDH, PD-L1, $\beta$ -Aktin und $\beta$ -Tubulin..... | 38 |
| Tabelle 20: Verwendete HRP-konjugierte Sekundärantikörper .....   | 39 |
| Tabelle 21: Fixierlösung, 4 % PFA .....   | 40 |
| Tabelle 22: Verwendete Programme .....  | 40 |
| Tabelle 23: Zusammensetzung des PD-L1-Plasmid-Transfektionsmixes, Volumen<br>pro Well .....   | 44 |
| Tabelle 24: Zusammensetzung des Kontrollvektor-Transfektionsmixes,<br>Volumen pro Well .....  | 45 |
| Tabelle 25: Zellzahl pro Kammern der Objektträger .....   | 46 |
| Tabelle 26: Zellbestandteile der einzelnen Fraktionen .....   | 54 |
| Tabelle 27: Verwendete Primärantikörper .....   | 59 |

**Tabelle 28: Verwendete Sekundärantikörper .....59**

## 10. Literaturverzeichnis

1. Alaizari NA, Al-Maweri SA. Oral cancer: knowledge, practices and opinions of dentists in yemen. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(14):5627–31. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.14.5627. PubMed PMID: 25081677.
2. Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis T. Multifactorial Contribution of Notch Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2019;20(6). doi: 10.3390/ijms20061520. PubMed PMID: 30917608; PubMed Central PMCID: PMC6471940.
3. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014;26(2):123–41. doi: 10.1016/j.coms.2014.01.001. PubMed PMID: 24794262; PubMed Central PMCID: PMC4040236.
4. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* 2016;91(1):13–23. doi: 10.1159/000446117. PubMed PMID: 27245686.
5. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2015: Median Age at Diagnosis and Death, CSR 1975-2015.
6. RIVERA C, VENEGAS B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* 2014;8(1):7–11. doi: 10.3892/ol.2014.2103. PubMed PMID: 24959211; PubMed Central PMCID: PMC4063640.
7. Hakelius M, Reyhani V, Rubin K, Gerdin B, Nowinski D. Normal Oral Keratinocytes and Head and Neck Squamous Carcinoma Cells Induce an Innate Response of Fibroblasts. *Anticancer Res* 2016;36(5):2131–7. PubMed PMID: 27127114.
8. Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. *J Oral Pathol Med* 2018;47(9):803–7. doi: 10.1111/jop.12733. PubMed PMID: 29752860.
9. Nakazawa S, Sakata K-I, Liang S, Yoshikawa K, Iizasa H, Tada M, et al. Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells. *Biomed Res* 2019;40(1):37–49. doi: 10.2220/biomedres.40.37. PubMed PMID: 30787262.
10. Padhi SS, Roy S, Kar M, Saha A, Roy S, Adhya A, et al. Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2017;73:27–35. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.030. PubMed PMID: 28939073.
11. Miyazaki Y, Yoshida N, Nozaki T, Inoue H, Kikuchi K, Kusama K. Telomerase activity in the occurrence and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci* 2015;57(4):295–303. doi: 10.2334/josnurd.57.295. PubMed PMID: 26666852.
12. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(16):2164–70. doi: 10.1200/JCO.2006.06.6605. PubMed PMID: 17538160.
13. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009;207(10):471–5. doi: 10.1038/sj.bdj.2009.1009.

14. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma. *Dent Clin North Am* 2014;58(2):315–40. doi: 10.1016/j.cden.2013.12.004. PubMed PMID: 24655525.
15. Gan L-L, Zhang H, Guo J-H, Fan M-W. Prevalence of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a case-control study in Wuhan, China. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(14):5861–5. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.14.5861. PubMed PMID: 25081714.
16. Jiang S, Dong Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. *Curr Probl Cancer* 2017;41(5):323–7. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2017.02.006. PubMed PMID: 28416242.
17. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* 2018;52(Pt 2):228–40. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.008. PubMed PMID: 29355614.
18. Sheldon LA. Inhibition of E2F1 activity and cell cycle progression by arsenic via retinoblastoma protein. *Cell Cycle* 2017;16(21):2058–72. doi: 10.1080/15384101.2017.1338221. PubMed PMID: 28880708; PubMed Central PMCID: PMC5731421.
19. Sun Y, Liu N, Guan X, Wu H, Sun Z, Zeng H. Immunosuppression Induced by Chronic Inflammation and the Progression to Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mediators Inflamm* 2016;2016:5715719. doi: 10.1155/2016/5715719. PubMed PMID: 28053372; PubMed Central PMCID: PMC5178366.
20. Moergel M, Karbach J, Kunkel M, Wagner W. Oral squamous cell carcinoma in the vicinity of dental implants. *Clin Oral Investig* 2014;18(1):277–84. doi: 10.1007/s00784-013-0968-5. PubMed PMID: 23504205.
21. 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* 2007;370(9581):59–67. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61050-2.
22. 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. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03181.x. PubMed PMID: 20659094.
23. Masserot C, Peffault de Latour R, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* 2008;113(12):3315–22. doi: 10.1002/cncr.23954. PubMed PMID: 18831513.
24. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology* 2010;46(6):414–7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009. PubMed PMID: 20400366.
25. Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018;125(6):628–36. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.010. PubMed PMID: 29656948.
26. Ernani V, Saba NF. Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management. *Oncology* 2015;89(4):187–95. doi: 10.1159/000398801. PubMed PMID: 26088938.
27. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *The Lancet* 2008;371(9625):1695–709. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X.

28. Gharat SA, Momin M, Bhavsar C. Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Treatment Strategies and Nanotechnology-Based Approaches for Prevention and Therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2016;33(4):363–400. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016016272. PubMed PMID: 27910740.
29. Bewley AF, Farwell DG. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol* 2017;35(5):461–7. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.06.008. PubMed PMID: 28916027.
30. Afzali P, Ward BB. Management of the Neck in Oral Squamous Cell Carcinoma: Background, Classification, and Current Philosophy. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2019;31(1):69–84. doi: 10.1016/j.coms.2018.09.004. PubMed PMID: 30449527.
31. Hartner L. Chemotherapy for Oral Cancer. *Dent Clin North Am* 2018;62(1):87–97. doi: 10.1016/j.cden.2017.08.006. PubMed PMID: 29126496.
32. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2014;50(7):627–32. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.04.003.
33. Betka J. Distant metastases from lip and oral cavity cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63(4):217–21. doi: 10.1159/000055744. PubMed PMID: 11408816.
34. Nemati M, Malla N, Yadav M, Khorramdelazad H, Jafarzadeh A. Humoral and T cell-mediated immune response against trichomoniasis. *Parasite Immunol* 2018;40(3). doi: 10.1111/pim.12510. PubMed PMID: 29266263.
35. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* 2016;148(2):125–39. doi: 10.1111/imm.12597. PubMed PMID: 26878338; PubMed Central PMCID: PMC4863567.
36. Demaria O, Cornen S, Daëron M, Morel Y, Medzhitov R, Vivier E. Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* 2019;574(7776):45–56. doi: 10.1038/s41586-019-1593-5. PubMed PMID: 31578484.
37. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017. PubMed PMID: 20061006.
38. Zhang Q, Vignali DAA. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* 2016;44(5):1034–51. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.017. PubMed PMID: 27192568; PubMed Central PMCID: PMC4873959.
39. Huang C, Zhu H-X, Yao Y, Bian Z-H, Zheng Y-J, Li L, et al. Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2019;104:102333. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102333. PubMed PMID: 31564474.
40. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 2018;48(3):434–52. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014. PubMed PMID: 29562194.
41. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* 2016;9:5023–39. doi: 10.2147/OTT.S105862. PubMed PMID: 27574444; PubMed Central PMCID: PMC4990391.
42. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(4):203–20. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.168. PubMed PMID: 27805626.

43. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular Immunology* 2014;290(1):72–9. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.05.006.
44. Bally APR, Lu P, Tang Y, Austin JW, Scharer CD, Ahmed R, et al. NF- $\kappa$ B Regulates PD-1 Expression in Macrophages. *J.I.* 2015;194(9):4545–54. doi: 10.4049/jimmunol.1402550.
45. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019;234(10):16824–37. doi: 10.1002/jcp.28358. PubMed PMID: 30784085.
46. Finger LR, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy RR, et al. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 1997;197(1-2):177–87. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00260-6.
47. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J.I.* 2004;173(2):945–54. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945. PubMed PMID: 15240681.
48. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med* 2016;375(18):1767–78. doi: 10.1056/NEJMra1514296. PubMed PMID: 27806234; PubMed Central PMCID: PMC5575761.
49. Lin DY-W, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su H-P, Mikami B, et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(8):3011–6. doi: 10.1073/pnas.0712278105. PubMed PMID: 18287011; PubMed Central PMCID: PMC2268576.
50. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(19):6501–5. PubMed PMID: 14559843.
51. Haanen JBAG, Robert C. Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog Tumor Res* 2015;42:55–66. doi: 10.1159/000437178. PubMed PMID: 26382943.
52. Przybylski K, Majchrzak E, Weselik L, Golusiński W. Immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Immune checkpoint blockade. *Otolaryngol Pol* 2018;72(6):10–6. doi: 10.5604/01.3001.0012.4367. PubMed PMID: 30647199.
53. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0131403. PubMed PMID: 26114883; PubMed Central PMCID: PMC4483169.
54. Cho Y-A, Yoon H-J, Lee J-I, Hong S-P, Hong S-D. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2011;47(12):1148–53. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.007. PubMed PMID: 21911310.
55. Zheng A, Li F, Chen F, Zuo J, Wang L, Wang Y, et al. PD-L1 promotes head and neck squamous cell carcinoma cell growth through mTOR signaling. *Oncol Rep* 2019;41(5):2833–43. doi: 10.3892/or.2019.7053. PubMed PMID: 30864729; PubMed Central PMCID: PMC6448093.
56. Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, et al. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in

- Ovarian Cancer and Melanoma. *Cancer Res* 2016;76(23):6964–74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0258. PubMed PMID: 27671674; PubMed Central PMCID: PMC5228566.
57. Chen L, Xiong Y, Li J, Zheng X, Zhou Q, Turner A, et al. PD-L1 Expression Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;42(6):2267–80. doi: 10.1159/000480000. PubMed PMID: 28848143.
  58. Manukian G, Bar-Ad V, Lu B, Argiris A, Johnson JM. Combining Radiation and Immune Checkpoint Blockade in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 2019;9:122. doi: 10.3389/fonc.2019.00122. PubMed PMID: 30895168; PubMed Central PMCID: PMC6414812.
  59. Wang Y, Kim TH, Fouladdel S, Zhang Z, Soni P, Qin A, et al. PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells Increases during Radio(chemo)therapy and Indicates Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 2019;9(1):566. doi: 10.1038/s41598-018-36096-7. PubMed PMID: 30679441; PubMed Central PMCID: PMC6345864.
  60. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nat Commun* 2017;8(1):1751. doi: 10.1038/s41467-017-01883-9. PubMed PMID: 29170499; PubMed Central PMCID: PMC5701012.
  61. Specenier P. Nivolumab in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018;18(5):409–20. doi: 10.1080/14737140.2018.1456337. PubMed PMID: 29560755.
  62. Ho WJ, Mehra R. Pembrolizumab for the treatment of head and neck squamous cell cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2019;19(9):879–85. doi: 10.1080/14712598.2019.1644315. PubMed PMID: 31317798.
  63. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn M-J, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 2019;393(10167):156–67. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31999-8.
  64. Karabajakian A, Reverdy T, Gau M, Fayette J. Nivolumab in recurrent/metastatic head and neck cancers. *Future Oncol* 2018;14(7):603–9. doi: 10.2217/fon-2017-0440. PubMed PMID: 29130342.
  65. Palmieri DJ, Carlino MS. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Curr Oncol Rep* 2018;20(9):72. doi: 10.1007/s11912-018-0718-6. PubMed PMID: 30066230.
  66. Ling DC, Bakkenist CJ, Ferris RL, Clump DA. Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer. *Semin Radiat Oncol* 2018;28(1):12–6. doi: 10.1016/j.semradonc.2017.08.009. PubMed PMID: 29173750.
  67. Frelaut M, Le Tourneau C, Borcoman E. Hyperprogression under Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2019;20(11). doi: 10.3390/ijms20112674. PubMed PMID: 31151303; PubMed Central PMCID: PMC6600249.
  68. Kato S, Goodman A, Walavalkar V, Barkauskas DA, Sharabi A, Kurzrock R. Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate. *Clin Cancer Res* 2017;23(15):4242–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3133. PubMed PMID: 28351930; PubMed Central PMCID: PMC5647162.
  69. Qin J-J, Li X, Hunt C, Wang W, Wang H, Zhang R. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: Recent advances and implications in cancer medicine. *Genes Dis* 2018;5(3):204–19.



- doi: 10.1016/j.gendis.2018.07.002. PubMed PMID: 30320185; PubMed Central PMCID: PMC6176154.
70. Derer A, Deloch L, Rubner Y, Fietkau R, Frey B, Gaigl 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. doi: 10.3389/fimmu.2015.00505. PubMed PMID: 26500646; PubMed Central PMCID: PMC4597129.
  71. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* 2007;29(2):163–88. doi: 10.1002/hed.20478. PubMed PMID: 17312569.
  72. Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, et al. Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 1989;49(18):5167–75. PubMed PMID: 2766286.
  73. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995;70(5):220–33. doi: 10.3109/10520299509108199. PubMed PMID: 8580206.
  74. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;32:5–8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5. PubMed PMID: 7951748.
  75. Chemistry of Protein Assays | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet] [cited 2020 May 15]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>.
  76. Schulz D, Stancev I, Sorrentino A, Menevse A-N, Beckhove P, Brockhoff G, et al. Increased PD-L1 expression in radioresistant HNSCC cell lines after irradiation affects cell proliferation due to inactivation of GSK-3beta. *Oncotarget* 2019;10(5):573–83. doi: 10.18632/oncotarget.26542. PubMed PMID: 30728908; PubMed Central PMCID: PMC6355177.
  77. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017;19(6):1189–201. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031. PubMed PMID: 28494868; PubMed Central PMCID: PMC6420824.
  78. Sander H, Wallace S, Plouse R, Tiwari S, Gomes AV. Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Anal Biochem* 2019;575:44–53. doi: 10.1016/j.ab.2019.03.010. PubMed PMID: 30914243; PubMed Central PMCID: PMC6954006.
  79. Alevizopoulos K, Calogeropoulou T, Lang F, Stournaras C. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors in cancer. *Curr Drug Targets* 2014;15(10):988–1000. PubMed PMID: 25198786.
  80. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* 2015;3(1):1–11. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0209. PubMed PMID: 25568067; PubMed Central PMCID: PMC4288010.
  81. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 2016;18(1):84. doi: 10.1186/s13058-016-0740-2. PubMed PMID: 27515302; PubMed Central PMCID: PMC4982339.
  82. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*

- 2019;18. doi: 10.1186/s12943-018-0928-4. PubMed PMID: 30646912; PubMed Central PMCID: PMC6332843.
83. Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibañez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep* 2017;20(8):1818–29. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.075. PubMed PMID: 28834746.
  84. Chakrabarti J, Holokai L, Syu L, Steele NG, Chang J, Wang J, et al. Hedgehog signaling induces PD-L1 expression and tumor cell proliferation in gastric cancer. *Oncotarget* 2018;9(100):37439–57. doi: 10.18632/oncotarget.26473. PubMed PMID: 30647844; PubMed Central PMCID: PMC6324774.
  85. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences* 2012;9(3). doi: 10.7150/ijms.3635. PubMed PMID: 22408567.
  86. Tu X, Qin B, Zhang Y, Zhang C, Kahila M, Nowsheen S, et al. 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* 2019;74(6):1215-1226.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.005. PubMed PMID: 31053471; PubMed Central PMCID: PMC6737939.
  87. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20(11):698–714. doi: 10.1038/s41580-019-0152-0. PubMed PMID: 31263220; PubMed Central PMCID: PMC7315405.
  88. Sato H, Jeggo PA, Shibata A. Regulation of programmed death-ligand 1 expression in response to DNA damage in cancer cells: Implications for precision medicine. *Cancer Sci* 2019;110(11):3415–23. doi: 10.1111/cas.14197. PubMed PMID: 31513320; PubMed Central PMCID: PMC6824998.
  89. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2018;293(27):10512–23. doi: 10.1074/jbc.TM117.000374. PubMed PMID: 29247009; PubMed Central PMCID: PMC6036208.
  90. Essid N, Chambard JC, Elgaaïed AB. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and Gli1 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) spheroid cultures. *Bosn J Basic Med Sci* 2018;18(4):336–46. doi: 10.17305/bjbms.2018.3243. PubMed PMID: 30172250; PubMed Central PMCID: PMC6252098.
  91. Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulis V, Burtneß B, et al. Markers of epithelial to mesenchymal transition in association with survival in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS ONE* 2014;9(4):e94273. doi: 10.1371/journal.pone.0094273. PubMed PMID: 24722213; PubMed Central PMCID: PMC3983114.
  92. Gupta HB, Clark CA, Yuan B, Sareddy G, Pandeswara S, Padron AS, et al. Tumor cell-intrinsic PD-L1 promotes tumor-initiating cell generation and functions in melanoma and ovarian cancer. *Sig Transduct Target Ther* 2016;1(1). doi: 10.1038/sigtrans.2016.30.
  93. Lee Y, Shin JH, Longmire M, Wang H, Kohrt HE, Chang HY, et al. CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell-Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1. *Clin Cancer Res* 2016;22(14):3571–81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2665. PubMed PMID: 26864211; PubMed Central PMCID: PMC5623594.

94. Fei Z, Deng Z, Zhou L, Li K, Xia X, Xie R. PD-L1 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Through Activation of the PI3K/AKT Pathway. *Oncol Res* 2019;27(7):801–7. doi: 10.3727/096504018X15446984186056. PubMed PMID: 30982497.
95. Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2013;49(4):287–92. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.10.009. PubMed PMID: 23182398; PubMed Central PMCID: PMC3586749.
96. Ock C-Y, Kim S, Keam B, Kim M, Kim TM, Kim J-H, et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(13):15901–14. doi: 10.18632/oncotarget.7431. PubMed PMID: 26893364; PubMed Central PMCID: PMC4941285.
97. Zheng F, Dang J, Zha H, Zhang B, Lin M, Cheng F. PD-L1 Promotes Self-Renewal and Tumorigenicity of Malignant Melanoma Initiating Cells. *Biomed Res Int* 2017;2017:1293201. doi: 10.1155/2017/1293201. PubMed PMID: 29250533; PubMed Central PMCID: PMC5700500.
98. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014;74(19):5458–68. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1258. PubMed PMID: 25274032.
99. Azad A, Yin Lim S, D'Costa Z, Jones K, Diana A, Sansom OJ, et al. PD-L1 blockade enhances response of pancreatic ductal adenocarcinoma to radiotherapy. *EMBO Mol Med* 2017;9(2):167–80. doi: 10.15252/emmm.201606674. PubMed PMID: 27932443; PubMed Central PMCID: PMC5286375.
100. Fujimoto D, Uehara K, Sato Y, Sakanoue I, Ito M, Teraoka S, et al. Alteration of PD-L1 expression and its prognostic impact after concurrent chemoradiation therapy in non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep* 2017;7. doi: 10.1038/s41598-017-11949-9. PubMed PMID: 28900290; PubMed Central PMCID: PMC5595796.
101. Sato H, Okonogi N, Nakano T. Rationale of combination of anti-PD-1/PD-L1 antibody therapy and radiotherapy for cancer treatment. *Int J Clin Oncol* 2020;25(5):801–9. doi: 10.1007/s10147-020-01666-1. PubMed PMID: 32246277; PubMed Central PMCID: PMC7192886.
102. Chen M-F, Chen P-T, Chen W-C, Lu M-S, Lin P-Y, Lee KD. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. *Oncotarget* 2016;7(7):7913–24. doi: 10.18632/oncotarget.6861. PubMed PMID: 26761210; PubMed Central PMCID: PMC4884963.
103. Xie F, Xu M, Lu J, Mao L, Wang S. The role of exosomal PD-L1 in tumor progression and immunotherapy. *Mol Cancer* 2019;18(1):146. doi: 10.1186/s12943-019-1074-3. PubMed PMID: 31647023; PubMed Central PMCID: PMC6813045.
104. Ni J, Bucci J, Malouf D, Knox M, Graham P, Li Y. Exosomes in Cancer Radioresistance. *Front Oncol* 2019;9. doi: 10.3389/fonc.2019.00869. PubMed PMID: 31555599; PubMed Central PMCID: PMC6742697.
105. Tang Y, Zhang P, Wang Y, Wang J, Su M, Wang Y, et al. The Biogenesis, Biology, and Clinical Significance of Exosomal PD-L1 in Cancer. *Front Immunol*

- 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00604. PubMed PMID: 32322256; PubMed Central PMCID: PMC7158891.
106. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006. PubMed PMID: 20601276.
  107. Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, et al. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica* 2015;62(2). doi: 10.18388/abp.2015\_970. PubMed PMID: 26098714.
  108. Poggio M, Hu T, Pai C-C, Chu B, Belair CD, Chang A, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* 2019;177(2):414-427.e13. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.016. PubMed PMID: 30951669; PubMed Central PMCID: PMC6499401.
  109. Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E, Al-Romaih K, Tulbah A, Al-Alwan M, et al. 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* 2010;12(4):R48. doi: 10.1186/bcr2605. PubMed PMID: 20626886; PubMed Central PMCID: PMC2949635.
  110. Hua D, Sun J, Mao Y, Chen L-J, Wu Y-Y, Zhang X-G. B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012;18(9):971–8. doi: 10.3748/wjg.v18.i9.971. PubMed PMID: 22408358; PubMed Central PMCID: PMC3297058.
  111. Qu Q-X, Xie F, Huang Q, Zhang X-G. Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(5):1893–906. doi: 10.1159/000484109. PubMed PMID: 29055949.
  112. Chen L, Deng H, Lu M, Xu B, Wang Q, Jiang J, et al. B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(9):6015–23. PubMed PMID: 25337246; PubMed Central PMCID: PMC4203217.
  113. Hasan A, Ghebeh H, Lehe C, Ahmad R, Dermime S. Therapeutic targeting of B7-H1 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15(10):1211–25. doi: 10.1517/14728222.2011.613826. PubMed PMID: 21870995.
  114. Satelli A, Batth IS, Brownlee Z, Rojas C, Meng QH, Kopetz S, et al. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep* 2016;6. doi: 10.1038/srep28910. PubMed PMID: 27363678; PubMed Central PMCID: PMC4929464.

## 11. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Erstgutachter PD Dr. Richard Bauer bedanken für die Bereitschaft meine Doktorarbeit als Erstgutachter zu betreuen, für die tolle Betreuung im Labor, in allen Phasen der Doktorarbeit und die Bereitstellung des interessanten Themas.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Docheva für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Zweitgutachterin zu lesen und zu bewerten, bedanken.

Mein weiterer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Daniela Schulz für die Einarbeitung und das Erlernen sämtlicher Techniken im Labor, die großartige Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten, für die Anregungen und fachlichen Diskussionen der Ergebnisse, die Beantwortung aller Fragen sowie die Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön auch an Brigitta Hauer für die Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und Fragen rund um die Laborarbeit, die gute Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit immerzu unterstützt, aufgebaut und motiviert haben.

Melanie Streller, März 2020

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Melanie Streller

### Schul- und Berufsausbildung

10/2014 – heute **Studium der Zahnheilkunde**  
Universität Regensburg

09/2005 – 06/2013 **Allgemeine Hochschulreife**  
Gabrieli-Gymnasium Eichstätt

09/2001 – 06/2005 **Grundschule**  
Grundschule „Am Graben“ Eichstätt

### Berufserfahrung

Seit 04/2020 **Assistenz Zahnärztin**  
Hirschau

10/2018 – 02/2019 **Tutor im Studentenkurs**  
Universitätsklinikum Regensburg  
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

03/2018 – 11/2018 **Zahnärztlicher Notdienst**  
Universitätsklinikum Regensburg

09/2013 – 02/2014 **Freiwilliges Soziales Jahr**  
Klinikum Ingolstadt

### Fortbildungen

06/2019 **33. Oberpfälzer Zahnärztetag**

12/2018 **Straumann Akademie**  
Studentenkurs: Implantologie und Prothetik

11/2016 **Deutscher Zahnärztetag**  
Thema: Pflicht und Kür in der Patientenversorgung  
Frankfurt am Main