

Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann

**Der Einfluss der Chemotherapie auf
Adenosin-produzierende Lymphozyten in Patienten mit
Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Andreas Ziebart

Geboren in Batamschinsk

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Patrick Schuler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Kapapa

Tag der Promotion: 13.12.2018

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis:	III
1. Einleitung	1
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region und seine medikamentösen Behandlungsformen	1
1.2 Immune Escape Mechanismen	5
1.3 Adenosin im onkologischen Mikromilieu	6
1.4 Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Probengewinnung	9
2.2 Dichtegradientenzentrifugation und Kryokonservierung	11
2.3 B-Zell-Isolation und Zellkultur	12
2.4 Durchflusszytometrie	13
2.5 ATP-Lumineszenzmessung	15
2.6 Massenspektrometrie	16
2.7 Statistische Auswertung	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Humane B-Zellen unter Chemotherapie <i>in vivo</i>	20
3.2 Humane B-Zellen unter Chemotherapie <i>in vitro</i>	28
3.3 Humane T-Zellen unter Chemotherapie	37
4. Diskussion	41
4.1 Auswirkungen von Cisplatin auf B-Zellen	41
4.2 Effekte von Methotrexat auf B-Zellen	43
4.3 Einfluss einer Radiochemotherapie auf T-Zellen	44

5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	50
Danksagung	63
Lebenslauf.....	64

Abkürzungsverzeichnis:

5`-AMP	Adenosin-5`-monophosphat
5-FU	5-Fluorouracil
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR7	Chemokinrezeptor vom Typ 7
CD	Cluster of differentiation / Unterscheidungsgruppen
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco`s phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor / Rezeptor für Wachstumsfaktoren
EK	Endkonzentration
FACS	Fluorescence activated cell sorting / Durchflusszytometrie
FBS	Fetal bovine serum / Fetales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3 / Transkriptionsfaktor
g	Mittlere Erdbeschleunigung
HPV	Humane Papillomviren
IgA/IgM	Immunglobulin der Klasse A/M
IL	Interleukin
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting / Magnetische Sortierung von Zellen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mM	Millimol

MTX	Methotrexat
N	Anzahl
NF-kappaB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells / Transkriptionsfaktor
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells / mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1; PD-L2	Programmed cell death 1 ligand 1; Programmed cell death 1 ligand 2
PKH	Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
RCT	Radiochemotherapie
rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute / Zellkulturmedium
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TGF- β	Transforming growth factor beta / Transformierender Wachstumsfaktor Beta
U	Unit / Enzymeinheit
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region und seine medikamentösen Behandlungsformen

Hintergrund

Mit weltweit über 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr, einer 5-Jahres Überlebensrate von unter 50% und einem häufig fortgeschrittenen Tumorstadium bei Diagnosestellung, stellt das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (PKH) eine präventive und therapeutische Herausforderung dar. Zu den häufigsten Eigenschaften des PKH zählen chirurgisch anspruchsvolle Lokalisationen, frühe Metastasierung und die lokale Infiltration von wichtigen Organen. Dies erfordert eine individuelle therapeutische Herangehensweise, welche oftmals aus der Kombination verschiedener Methoden besteht. Neben den etablierten Verfahren der chirurgischen Resektion und Radiochemotherapie hat sich nun auch die Immuntherapie als viertes therapeutisches Standbein etabliert. Eine Therapieempfehlung erfolgt in der Regel im Rahmen der interdisziplinären Tumorkonferenz unter Einbezug der Fachrichtungen Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Onkologie, Strahlentherapie, Radiologie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Nuklearmedizin und Pathologie.

Neben der karzinogenen Wirkung der Hauptrisikofaktoren Tabakrauch und Alkohol sind mehrere Arten der risikobehafteten humanen Papillomviren (HPV) an der Entwicklung sowohl von Zervix- als auch von Oropharynxkarzinomen beteiligt [8,19]. Eine bedeutende Rolle innerhalb der Entstehung und Erhaltung des Tumorwachstums spielt darüber hinaus eine von Immunzellen geleitete Entzündungsreaktion und die durch Tumore gesteuerte Manipulation von Signalmolekülen [14].

Chemotherapie

Während in frühen Stadien vorzugsweise eine chirurgische oder strahlentherapeutische Therapie empfohlen wird, kommt die primär kurative Chemotherapie vorwiegend bei fortgeschrittenen oder irresektablen Tumoren, kombiniert mit der Strahlentherapie zum Einsatz. Hierzu ist belegt, dass die Hinzugabe einer Chemotherapie einen Überlebensvorteil erbringt [2,10]. Bestätigende Studien mit einem Verweis auf die Überlegenheit der begleitenden Chemotherapie gegenüber einer Induktionstherapie und alleinigen Strahlentherapie folgten [1,7,26]. So erhöht die simultane Chemotherapie die Strahlensensibilität der Tumorzellen und führt zu einem räumlichen Zusammenwirken beider Therapieformen, welche dennoch unabhängig voneinander am Tumor wirksam sind [33]. Die beschriebenen Effekte führen zu einer Verstärkung der Strahlentherapie sowie einer möglichen Vernichtung kleinster Metastasen, wodurch die simultane Radiochemotherapie ebenfalls eine Therapieoption für einen favorisierten Organerhalt darstellt.

Neben Cisplatin und dem verwandten Wirkstoff Carboplatin, werden überwiegend 5-Fluorouracil, Mitomycin C und die Gruppe der Taxane, einzeln oder in Kombination, eingesetzt [75]. Wie die meisten Chemotherapeutika sind auch die genannten zunächst nicht auf der Basis einer vorhandenen Zielstruktur innerhalb einer Tumorzelle, sondern aufgrund ihres breiten zytotoxischen Effekts auf eine Vielzahl organischer Moleküle entdeckt und eingesetzt worden.

Die Induktionschemotherapie spielt eine besondere Rolle hinsichtlich einer möglichen organerhaltenden Behandlung im Sinne einer Chemoselektion und in Situationen, bei denen eine Fernmetastasierung wahrscheinlich scheint. Häufig erfolgt sie durch eine Zweifachkombination mit Cisplatin sowie 5-FU und einer konventionell fraktionierten Radiatio oder einer Dreifachkombination der genannten Zytostatika zusammen mit Docetaxel. Ziel ist es Tumoranteile, die nicht von einer lokalen Therapie erfasst werden, durch eine frühe Behandlung effektiver zu schädigen [13,77].

Chemotherapeutika der genannten Medikamentengruppen, in ähnlicher oder gleicher Kombination, werden auch für die neoadjuvante Behandlung verwendet. Allerdings wird eine nachfolgende Resektion des Tumors angestrebt.

Die zytostatische Therapie soll zu einer Verkleinerung des Primärtumors führen, welche eine weniger radikale Operation nach sich ziehen könnte [11].

Ähnlich der primären simultanen Radiochemotherapie, zeigt die adjuvante Chemotherapie in erster Linie einen Überlebensvorteil in Kombination mit einer Bestrahlung auf [5]. Die adjuvante Chemotherapie hat den Zweck, nach einer stattgehabten chirurgischen oder strahlentherapeutischen Behandlung, etwaige Tumorreste zu beseitigen.

Weiterhin gehört die chemotherapeutische Einzeltherapie zur Bandbreite palliativer Konzepte. Patienten, bei denen die Tumorerkrankung nicht mehr sinnvoll durch eine lokale Therapie behandelt werden kann, erhalten überwiegend MTX, Platine, 5-FU, Taxane oder den gegen EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab als Monotherapie. Bedeutsam ist der Erhalt der Lebensqualität unter Abwägung der zu erwartenden Toxizität.

Trotz der vielfältigen Wirkungsweisen einer Chemotherapie stellen Lokalrezidive, Zweittumore und die Entwicklung von Fernmetastasen häufige Gründe für ein Therapieversagen dar. Folglich sind weitere Untersuchungen zu ihren systemischen Wirkungen unerlässlich. Die durch ihre Myelosuppression historisch als nachteilig betrachtete Rolle der Chemotherapie gegenüber einer suffizienten Immunantwort wurde in den letzten Jahren neu beleuchtet. Mehrere Mechanismen stützten die Annahme, dass ebenfalls eine immunologische Tumorbekämpfung gefördert werden kann [20].

Immuntherapie

Eine weitere, sich zunehmend etablierende Behandlungsform für das PKH ist die Immuntherapie. Die routinemäßige Nutzung hat sich lange auf die EGFR-Inhibition in ausgewählten palliativen Situationen oder in Kombination mit einer Strahlentherapie beschränkt [30]. Allerdings hat sich der Fokus klinischer Studien in den letzten Jahren erheblich von der Wachstumsinhibition mittels Antikörper und Tumorimpfung hin zur Immunmodulation von Immun-Checkpoints gewandelt [58].

Die in den letzten Jahren entwickelten Checkpoint-Inhibitoren stellen effektive Angriffspunkte dar, an denen mittels spezifischer Antikörper die Immunantwort

gestärkt werden kann. Die Aktivierung einer T-Zelle erfolgt entweder über antigenpräsentierende Zellen durch MHC-II oder über Tumorzellen mittels MHC-I. Diese Aktivierung kann jedoch über eine Reihe von molekularen Kontrollpunkten, wie zum Beispiel den Programmed-Death-1 Rezeptor (PD-1) negativ reguliert werden [49]. Im gesunden Immunsystem verhindern die Checkpoints eine überschießende Immunreaktion im Sinne von Allergien und Autoimmunkrankheiten. In Tumorpatienten nutzen die Tumorzellen die Checkpoints als eine Form von Immune Escape in dem sie zum Beispiel den PD-1 Liganden (PD-L1) exprimieren und so die Immunantwort reduzieren.

Vielversprechende Therapieerfolge mit Checkpoint-Inhibitoren, wie Pembrolizumab und Nivolumab, in Patienten mit malignem Melanom führten zur Ausweitung der klinischen Anwendung auf eine Reihe anderer maligner Tumore wie auch dem PKH [22,61,81]. Aufgrund der positiven Ergebnisse mit verlängerten Überlebensraten in den behandelten Patienten erfolgte 2017 die Zulassung des PD-1 Inhibitors Nivolumab für die Therapie des Cisplatin-resistenten PKH. Weitere Checkpoints mit therapeutischem Potential beinhalten unter anderem die Familie des TNF- α -Rezeptors oder den NK-Zellspezifischen Killer Cell Immunoglobulin-like-Rezeptoren (KIR).

Neben dieser spezifischen Antikörpertherapie existieren auch unspezifische Formen der Immuntherapie wie zum Beispiel die peritumorale Injektion von Zytokinen, welche zu einer Aktivierung des Immunsystems führen sollen. So zeigte die tumornahe Injektion eines Zytokin-Gemisches ein erhöhtes Immuninfiltrat im Tumorgewebe, was möglicherweise den Effekt einer Chemotherapie verstärken kann [72].

Weitere Möglichkeiten einer immunmodulierenden Therapie bestehen in der Tumorstimmung und des Immuntransfers von *in vitro* stimulierten Lymphozyten beziehungsweise von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten [15,67,83].

Eine Chemotherapie induziert zum einen den immunologischen Zelltod einer Tumorzelle und unterbindet zum anderen die verschiedenen ‚Immune Escape‘ Mechanismen der Tumorzellen [21]. Dies stellt eine zukünftige,

erfolgsversprechende Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie in Aussicht.

1.2 Immune Escape Mechanismen

Theorien, die eine Fehlregulation des Immunsystems für die Entstehung von Tumoren mit verantwortlich machen, rücken seit der Beobachtung von Langzeit-immunsupprimierten Patienten erneut in den Vordergrund, da diese Patienten vermehrt unterschiedliche Tumorentitäten entwickeln, worunter sich auch das PKH befindet [6]. Des Weiteren verfügt ein bereits aufgetretenes PKH über verschiedene Mechanismen um der Immunantwort zu entgehen [78]. Hierzu zählen vor allem die Herstellung nur schwach immunogener Tumorantigene und die mangelnde immunologische Kostimulation, außerdem die Bildung und Förderung immunsuppressiver Faktoren sowie immunsuppressiver Zellpopulationen [57]. Das Erkennen von Antigenen der Tumorzellen und deren Bekämpfung wird durch einen Expressionsverlust der MHC-I Moleküle auf Tumorzellen oder Verringerung der T-Zell-vermittelten Signaltransduktion geschwächt [9].

Eine herausragende Rolle in Bezug auf immunsuppressive Zellreihen nehmen zahlreiche Subpopulationen CD25 positiver, regulatorischer T-Zellen ein [46,87]. Des Weiteren sind mesenchymale Stammzellen, myeloide Suppressorzellen und regulatorische B-Zellen an einer Unterdrückung der Immunantwort beteiligt [48,60].

Letzterer Gruppe gelingt dies unter anderem durch die Synthese immunsuppressiver Zytokine, wie TGF- β , IL-10 und Granzym B [39]. Die Funktion Tumor-infiltrierender B-Lymphozyten ist nicht abschließend geklärt. So konnte unter anderem in Patienten mit PKH eine Korrelation zwischen ihrem Auftreten und einer günstigeren Prognose nachgewiesen werden, gleichzeitig wurden jedoch wachstumsfördernde Eigenschaften auf Tumoren beschrieben [25,51]. Betrachtet man erneut die Stellung der regulatorischen B-Zellen, so zeigen diese aber eine ungünstigere Prognose für Patienten mit PKH, sollten sie den Tumor infiltrieren [85].

1.3 Adenosin im onkologischen Mikromilieu

Extrazelluläres Adenosin zeichnet sich als potenter Inhibitor des Immunsystems im Tumormikromilieu aus und kann unter anderem von regulatorischen Lymphozyten, mesenchymalen Stammzellen, Exosomen und Tumorzellen selbst gebildet werden [27]. Voraussetzung hierfür ist die Expression sogenannter Ektonukleotidasen, CD39 und CD73, auf der Zelloberfläche [79]. Das von nekrotischen Tumorzellen freigesetzte ATP wird durch das Enzym CD39 zu 5'-AMP und durch CD73 weiter zu Adenosin hydrolysiert (**Abbildung 1**). Humane T-Zellen im peripheren Blut exprimieren entweder CD39 oder CD73, aber nicht beide Enzyme gleichzeitig. Im Gegensatz hierzu sind mehr als 65% der humanen B-Zellen in der Lage, sowohl CD39 als auch CD73 zu exprimieren und besitzen somit die Fähigkeit selbstständig exogenes ATP in immunsuppressives Adenosin zu hydrolysieren [53]. Murine regulatorische T-Zellen verfügen wiederum über beide Oberflächenenzyme [17]. Eine weitere Ausnahme können schließlich in Tumorpatienten vorkommende, tumor-infiltrierende T-Zellen oder Tumor-induzierte regulatorische T-Zellen darstellen, welche ebenfalls über CD39 und CD73 verfügen [59]. Letztere stellen darüber hinaus immunsuppressives Prostaglandin E₂ her [79].

Zusätzlich kann das Tumorwachstum para- und autokrin über Adenosin-Rezeptoren auf Tumorzellen gefördert werden [28]. Dieser Zusammenhang konnte bereits explizit für das PKH aufgezeigt werden [35]. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von Adenosin im Körper werden durch verschiedene Adenosin-spezifische Rezeptoren (A₁₋₃) vermittelt [12]. Sobald Adenosin an oberflächlichen Rezeptoren von CD4⁺ T-Zellen bindet, wird deren Wachstum und Funktion über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels eingeschränkt. Für die inhibitorische Wirkung, wie der verringerten zytotoxischen Aktivität von T-Zellen und der vermehrten Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen, ist in erster Linie der A_{2A}-Rezeptor verantwortlich [31].

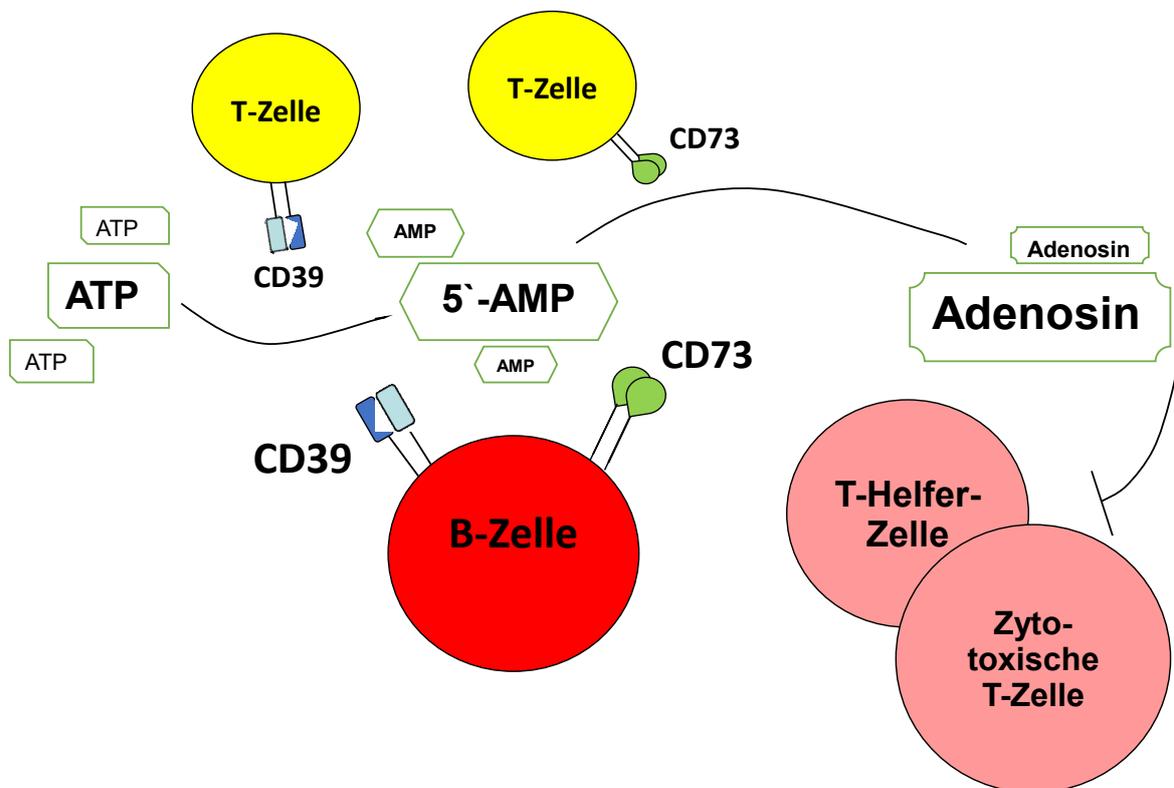


Abbildung 1: Die extrazelluläre Produktion von Adenosin durch regulatorische Lymphozyten bewirkt eine Immunsuppression. Die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 hydrolysieren ATP zu 5'-AMP und schließlich weiter zu Adenosin. 5'-AMP und Adenosin wirken inhibitorisch auf Immunzellen. Adenosin fördert ebenfalls das invasive Tumorstadium.

Die beschriebenen Zusammenhänge machen Adenosin und seine Rezeptoren zu einer potenziellen Zielstruktur für neue, antineoplastische Therapien. Kürzlich publizierte Arbeiten konnten so beispielsweise einen größeren Nutzen der Blockade von PD-1 aufzeigen, wenn diese mit einem Inhibitor des A2A-Rezeptors kombiniert wurde [4,44]. Eine Adenosin-Rezeptor-Blockade könnte demzufolge zum einen zu einer verringerten Proliferation von Tumorzellen führen und zum anderen eine suffiziente Immunantwort ermöglichen, wodurch sie eine vielversprechende Behandlungsoption darstellt. Des Weiteren stellen die Enzyme CD39 und CD73 selbst Zielstrukturen dar und somit die Möglichkeit den Signalweg zu blockieren. So konnte eine CD39-Blockade die immunogene Aktivität von Anthracyclinen wiederherstellen und die Inhibition von CD73 zeigte eine signifikante Reduktion des Tumorstadiums und der Bildung von Lungenmetastasen im Mausmodell [43,66].

Trotz der bedeutsamen Stellung von Adenosin im Hinblick auf die Tumorentstehung, fehlen weitreichende Erkenntnisse über den möglichen Einfluss, den eine antineoplastische Therapie auf die Bildung von Adenosin mit sich bringt.

1.4 Zielsetzung

Um synergetische Effekte der Chemotherapie und Immunantwort zu erreichen, wird die umfassende Kenntnis ihrer Interaktion vorausgesetzt.

Die zunehmende Tendenz, eine personalisierte Therapie mit Bezug auf Patienten- und Tumorcharakteristika zu erreichen, macht es ebenfalls erforderlich, Wechselwirkungen detailliert zu beschreiben. Daher befasst sich die vorliegende Arbeit eingehend mit dem chemotherapeutischen Einfluss auf das Immunsystem in Patienten mit Plattenepithelkarzinom in der Kopf-Hals-Region. Kern der Untersuchungen ist die Charakterisierung und funktionelle Überprüfung derjenigen Zellpopulationen, welche die Fähigkeit besitzen immunmodulierendes Adenosin zu produzieren. Zusätzlich sollen unterschiedliche Auswirkungen der verschiedenen Chemotherapeutika herausgearbeitet sowie dosisabhängige Einflüsse und Langzeiteffekte dargestellt werden.

Darüber hinaus wird die mögliche Therapie mit Inhibitoren des PD-1-Signalwegs in der Kombination mit einer Radiochemotherapie diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

Die freiwilligen Blutspender wurden über die experimentelle Nutzung der Zellen aufgeklärt (**Kohorte #1**). Ein entsprechendes Votum der örtlichen Ethikkommission lag vor (Universität Ulm 255/14). Nach schriftlicher Einwilligung der Probanden wurde 50 ml peripher venöses Blut von 20 gesunden Studienteilnehmern, 15 Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich, sowohl vor als auch nach ihrer erstmaligen Radiochemotherapie (RCT), und drei Patienten vor und nach palliativer Chemotherapie entnommen. Die Blutentnahme erfolgte mit mehreren 10 ml Citrat-haltigen und einem 5 ml EDTA-haltigen Röhrchen (beide S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht) in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, des Universitätsklinikums Ulm. Die Erstellung eines Differentialblutbildes und die damit beinhaltete Bestimmung der Lymphozytenzahl der Tumorpatienten, erfolgte im Zentrallabor durch das Standardprotokoll der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Ulm. Des Weiteren lagen durchflusszytometrische Messungen aus der Universität von Pittsburgh von 14 Patienten mit PKH nach unterschiedlich lang zurückliegender, erstmaliger und abgeschlossener RCT vor (**Kohorte #2**). Als Kontrollgruppe dienten 24 gesunde Spender. Auch in diesem Patientenkollektiv war die schriftliche Einwilligung mit entsprechendem Votum der Ethikkommission erfolgt (Universität Pittsburgh, USA, #991206). Die RCT umfasste mit einer Ausnahme, welche Mitomycin erhalten hatte, eine platinbasierte Chemotherapie und die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 44-70 Gray. Klinische und demografische Daten der Patienten sind in der **Tabelle 1** gelistet.

Tabelle 1: Klinische und demografische Daten zweier Patientenkohorten sowie von gesunden Spendern. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

	Kohorte #1	Gesunde Spender	Kohorte #2	Gesunde Spender
N (weiblich/männlich)	18 (4/14)	20 (13/7)	14 (1/13)	24 (6/18)
Alter (Größenordnung)	59 ± 10 (45-76)	50 ± 12 (19-67)	58 ± 13 (31-86)	28 ± 10 (23-60)
Stadium				
T1/T2/T3/T4	5 / 1 / 6 / 6		1 / 4 / 4 / 5	
nodaler Status				
N0/N1/N2	3 / 3 / 12		5 / 2 / 7	
Tumorlokalisation				
Mundhöhle	8		7	
Pharynx	4		3	
Larynx	4		3	
anderer	2		1	
Chemotherapie				
Cisplatin	13		12	
Carboplatin	1		2	
Methotrexat	3			
Mitomycin	1			
primäre RCT	8		0	
adjuvante RCT	7		14	
palliative Chemotherapie	3		0	

2.2 Dichtegradientenzentrifugation und Kryokonservierung

Separation peripherer mononukleärer Zellen

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation separiert, wofür Leucosep Tubes (50 ml) mit einer Trennscheibe aus Polyethylen von Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich) dienten. Das entnommene Vollblut wurde 2 : 1 mit DPBS (Gibco, Grand Island, USA) verdünnt und auf 15 ml Lymphozytenseparationslösung (Biocoll, Biochrom AG, Berlin) aufgeschichtet. Nach 15-minütiger Zentrifugation (800 g) bei Raumtemperatur und anschließendem, ungebremsten Halt wurde die entstandene Interphase entnommen. Die gewonnenen Zellen wurden in zwei weiteren Schritten mit DPBS gewaschen. Mit Hilfe von 4 ml Lysepuffer bestehend aus 150 mM Ammoniumchlorid, 0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 1 mM Kaliumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe) wurden daraufhin die verbliebenen Erythrozyten lysiert. Nach sechsminütiger Inkubation wurde die Reaktion unter Zugabe von DPBS abgebrochen und die Zellen im Sinne einer Waschung erneut zentrifugiert (400 g; 7 Minuten; 4 °C).

Die Zellzahl konnte durch eine Trypanblau-Färbung von Sigma-Aldrich und einer Neubauerzählkammer des Herstellers Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen) ermittelt werden. Die Gesamtzellzahl wurde mit nachfolgender Formel berechnet: Gezählte Zellen der vier Großquadrate x 0,25 x Verdünnungsfaktor x 10^4 x Volumen.

PBMC der zweiten Kohorte wurden unmittelbar im Anschluss für weitere Experimente verwendet.

Kryokonservierung

Zu PBMC der Tumorpatienten aus der ersten Kohorte wurden vorgekühlte Einfriermedien mit jeweils 500 µl 40% FBS (PAN Biotech, Aidenbach) und 20% DMSO (PAN Biotech) hinzugefügt, wobei die Zellzahl für jedes Einfrier Röhrchen (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) 10^6 bis maximal 10^7 betrug. Nach der Überführung in einen 4 °C kühlen, mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter (Nalgene, Thermo Fisher Scientific) wurde dieser bei -80 °C für mindestens 24 Stunden gelagert, bevor die Zellen weiter in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.3 B-Zell-Isolation und Zellkultur

B-Zell-Isolation

Blutproben gesunder Studienteilnehmer wurden verwendet um CD19⁺ B-Zellen zu isolieren und diese unter Zugabe von Zytostatika zu kultivieren. Sämtliche nachfolgenden Materialien für die Zellseparation stammen aus dem Sortiment des Unternehmens Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach).

Der Puffer für die Separation wurde aus MACS BSA Stock Solution® (5%) und autoMACS Rinsing Solution® (95%, enthält EDTA) erstellt.

Um CD19⁺ B-Zellen mittels negativer Isolation zu gewinnen, wurde zu den PBMC zunächst der Puffer hinzugefügt. Nachdem die Zellen resuspendiert waren, folgte eine Inkubation für 7 Minuten bei 4 °C zusammen mit einem biotinylierten Antikörpergemisch (B Cell Isolation Kit II), dessen Volumen 10 µl je 10⁷ Zellen betrug. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit MACS Puffer gemischt und anschließend mit 20 µl Anti-Biotin Antikörper je 10⁷ Zellen (B Cell Isolation Kit II), welchen Eisenpartikel anhafteten, versetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4 °C, bevor das Zellgemisch zusammen mit 300 µl MACS Puffer in eine Separationssäule übertragen wurde. Es durchlief die zuvor mit dem Puffer gespülte und in einen Magneten gespannte LS-Trennsäule, wobei die mit ferromagnetischen Kugeln befüllte Säule das Magnetfeld um ein Vielfaches verstärkte und markierte Zellpopulationen so in einer Suspension hielt. Durch die Abreicherung konnten die nicht markierten Zellen die Säule passieren. Zusätzlich wurden die Zellen durch drei weitere Gaben von 3 ml Puffer ausgespült. Die negative Selektion führte dazu, dass die isolierten B-Zellen keine Eisenpartikel auf der Oberfläche trugen, welche nachfolgende Analysen beeinflussen könnten. Die Reinheit der Zellen wurde durch eine nachfolgende FACS-Untersuchung bestimmt, welche bezogen auf CD19 als B-Lymphozytenmarker, immer mindestens 93% betrug.

Zellkultur

Isolierte B-Zellen wurden bei 37 °C und fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Hera Cell 150, Heraeus, Hanau) für sieben Tage kultiviert. Als Medium diente RPMI-Medium (Gibco), welches Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml; Gibco) und zu 10% FBS enthielt. Für die Zellkultur wurden Platten mit 96 Wells und flachen Böden verwendet (Falcon, Corning, USA). Je Well wurden 10⁵ Zellen inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Um die Zellen zu stimulieren wurde ein CD40 Ligand in einer Endkonzentration (EK) von 10 ng/ml, Hämagglutinin Peptid-Antikörper in einer EK von 423 ng/ml (beide R&D Systems, Minneapolis, USA) und IL-4 (CellGenix, Freiburg) in einer EK von 200 U/ml hinzugefügt.

Anschließend wurden die Zellen mit jeweils einem Zytostatikum behandelt (s. **Tabelle 2**). Die Endkonzentrationen der Zytostatika sind für die jeweiligen Versuche angegeben.

Tabelle 2: Zytostatika

Zytostatikum	Hersteller
Cisplatin	Teva, Ulm
Methotrexat	Pfizer, Berlin
5-Fluorouracil	Medac, Hamburg
Paclitaxel	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Cetuximab	Erbix [®] , Merck, Darmstadt

2.4 Durchflusszytometrie

Phänotypisierung

Die Oberflächencharakterisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers Gallios von Beckman Coulter (Brea, USA), welches eine Analyse auf Einzelzellebene erlaubt. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mit Kaluza™ Software (Beckman Coulter). Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gaben Aufschluss über die Größe und Granularität der Zellen, wodurch die Lymphozytenpopulation eingegrenzt werden konnte. 10 Fluoreszenzdetektoren und 3 Laser des Durchflusszytometers erlaubten es, die Proben mit mehreren

fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (s. **Tabelle 3**) zu färben um Oberflächenantigene zu kennzeichnen.

Dies geschah, nachdem die Zellen mit gekühltem DPBS gewaschen wurden, indem jeweils 2 bis 5 µl des Antikörpers in gelieferter Konzentration zu den Proben in Rundbodenröhrchen (Test Tube Blue von Beckman Coulter) hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben in Dunkelheit und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, bevor sie erneut mit 2 ml DPBS gewaschen wurden und nach Hinzugabe von 300 µl DPBS für die FACS-Analyse bereitstanden.

Als Konjugationen für die Antikörper wurden Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), R-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5), Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7), Allophycocyanin (APC) und Alexa Fluor 700 (AF700) verwendet.

Tabelle 3: FACS-Antikörper und Farbstoffe

Antikörper und Farbstoffe	Hersteller
CD73 FITC	eBioscience (San Diego, USA)
CD73 PE	
CD39 PE-Cy7	
CD4 AF700	
PD1 (CD279) PE	
CCR7 (CD197) PE-Cy7	
CD19 PE-Cy7	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgM PE	
CD5 AF700	
CD26 APC	Biologend (San Diego, USA)
CD25 FITC	
CD40 PE-Cy7	
CD25 PE	Milenty Biotec
IgA APC	

Zellproliferation

Um die Zellteilung und das Zellwachstum isolierter B-Zellen darzustellen, wurden sie mit CellTrace Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) (Thermo Fisher Scientific) gefärbt.

Zu 10^5 B-Zellen, die sich in 1 ml DPBS befanden, wurde $1,5 \mu\text{M}$ CFSE hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 37°C . Eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte nach der Zugabe von $7,5 \text{ ml}$ FBS. Daraufhin wurde das FBS nach einer Zentrifugation entfernt und die Zellen dreifach mit je 1 ml DPBS gewaschen.

CFSE diffundierte passiv in die Zellen und fluoreszierte erst als die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen abgespalten wurde. Da die Tochtergenerationen einen Teil des fest intrazellulär verankerten CFSE erhielten, konnten sie durchflusszytometrisch von der Ursprungspopulation abgegrenzt werden.

2.5 ATP-Lumineszenzmessung

Für die indirekte Quantifizierung des Abbaus von ATP durch B-Zellen wurden B-Zellen exogenem ATP (Sigma-Aldrich) ausgesetzt und dessen Gehalt nach 90 Minuten mittels Lumineszenzmessung bestimmt.

Die Grundlage dieses Experiments ist die Reaktion von ATP, Sauerstoff und D-Luciferin unter Zugabe des Glühwürmchenenzym Luciferase und Magnesiumionen. Resultate sind die Produkte Oxyluciferin, 5'-AMP , Diphosphat, Kohlenstoffdioxid und Licht. Letzteres verhält sich in einem bestimmten Ausmaß proportional zur ATP-Konzentration.

Für die Inkubation von jeweils 30.000 B-Zellen mit $20 \mu\text{M}$ ATP wurden weiße Mikrotiterplatten mit flachem Boden und 96 Vertiefungen (Greiner Bio-one) verwendet. Die Zellen befanden sich in einer DPBS-Lösung mit einem Volumen von $96 \mu\text{l}$. Das Volumen des gelösten ATP entsprach $4 \mu\text{l}$. Während der Inkubationszeit wurde die Platte zunächst für 5 Minuten mit 300 rpm bei 21°C geschüttelt und für die gesamte Zeit abgedunkelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je $50 \mu\text{l}$ lyophilisierten Substrat mit beigemengter Pufferlösung des ATPlite Luminescence Assay System der Firma PerkinElmer (Waltham, USA). Unmittelbar nach der Beigabe des Substrats wurde die Platte abgedunkelt und für weitere 5 Minuten geschüttelt. Nach insgesamt 10 Minuten wurde das emittierte Licht gemessen. Die Steuerung erfolgte durch das Programm i-control™, wobei dieses und das Lesegerät Infinite® 200 Pro Lumineszenz Reader der Firma Tecan aus Männedorf (Schweiz) entstammt. Negativkontrollen erfolgten, indem DPBS ohne Zusatz von ATP das Substrat hinzugefügt wurde.

2.6 Massenspektrometrie

Um die Aktivität der Ektonukleotidasen weiter zu quantifizieren, kam es zu Verwendung des mit einer Elektronensprüh-Ionisationsquelle ausgestatteten Massenspektrometers TSQ Quantum-Ultra Triple-Quadrupole (Thermo Fisher Scientific), dessen Verwendung kostenfrei durch Prof. Edwin K. Jackson aus dem pharmakologischen Institut der Universität Pittsburgh (USA) zur Verfügung gestellt wurde. Dadurch wurde die spezifische Messung der Purinderivate 5`-AMP und Adenosin, als auch dessen Abbauprodukt Inosin ermöglicht.

Zur Gewinnung der purinhaltigen Zellüberstände für die Massenspektrometrie wurden zunächst B-Zellen analog zu dem bereits aufgeführten Protokoll der ATP-Lumineszenzmessung für 60 Minuten mit ATP inkubiert. Allerdings wurde im Unterschied zu dem oben genannten Vorgehen 200 µl DPBS verwendet. Kontrollmessungen enthielten DPBS ohne ATP-Beigabe. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 2 Minuten und 1200 g zentrifugiert, 150 µl des Überstandes entnommen und dieser für 2 weitere Minuten gekocht um Adenosin-abreichernde Enzyme zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellüberstände für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

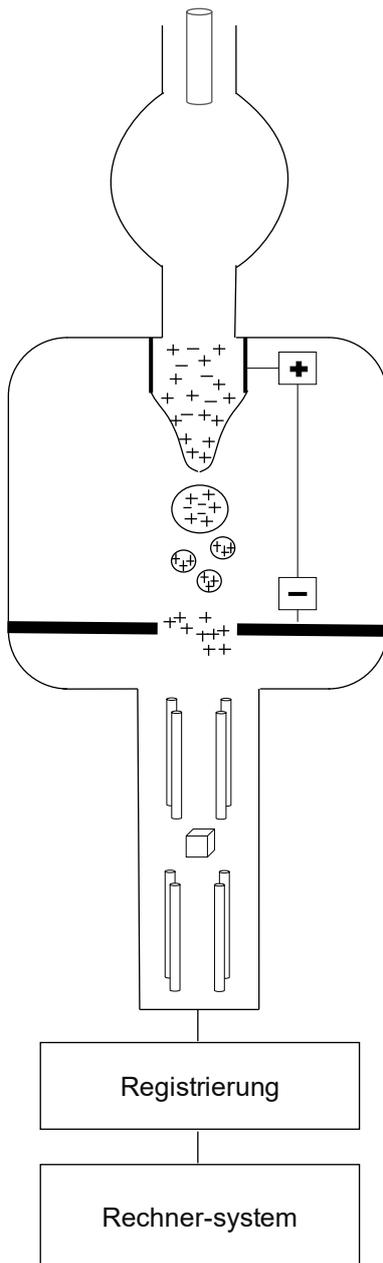
Für eine Strukturaufklärung und um Rückschlüsse auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Proben zu erhalten, eignete sich das Verfahren der kombinierten Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie, welches aus dem Bereich der instrumentellen Analytik stammt.

Vor der Detektion mit dem Massenspektrometer wurden die Proben mittels eines Hochleistungsflüssigchromatographie-Systems der Firma Waters aus Milford (USA) aufgetrennt. Das Verfahren basiert darauf, dass Proben in einer mobilen Phase gelöst werden und sich durch eine stationäre Phase bewegen. Unterschiedliche Verteilungsmuster aufgrund von Polaritätsunterschieden sorgten für die Entstehung von Signalen, die qualitativ und quantitativ untersucht werden konnten. Eine Trennsäule (UPLC BEH C18, Waters) wurde als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase diente zum einen einprozentige Essigsäure in Wasser und zum anderen Methanol mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,3 ml/Minute. Folgende Elutionsgradienten wurden verwendet (**Tabelle 4**):

Tabelle 4: Elutionsgradienten

Zeitverlauf [min]	einprozentige Essigsäure (in Wasser gelöst)	Methanol
0 – 2	99,5%	0,5%
2 – 3	98%	2%
3 – 4	85%	15%
4 – 5	99,5%	0,5%

Im Massenspektrometer wurde das aus der Säule kommende Eluat in der Gasphase zu Ionen umgewandelt, welche in einem elektrischen Feld beschleunigt und entsprechend ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis aufgetrennt wurden. Im Anschluss konnte erfasst werden welche relativen Mengen der Ionen entstanden sind. Folgende Masse-zu-Ladung-Übergänge wurden ermittelt: 348→136 für 5'-AMP; 358→141 für $^{13}\text{C}_{10}$ -5'-AMP; 268→136 für Adenosin; 278→141 für $^{13}\text{C}_{10}$ -Adenosin; 269 → 137 für Inosin und 269 → 137 für $^{15}\text{N}_4$ -Inosin. Den schematischen Aufbau eines Massenspektrometers zeigt **Abbildung 2**.



1. Die Proben werden über ein **Einlass-System** eingebracht.

2. Die Ionenquelle erzeugt einen gasförmigen Ionenstrahl, der zusätzlich beschleunigt und anschließend fokussiert wird (hier **Elektronenspray-Verfahren**).

3. Der **Massenanalysator** trennt Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (hier: Triple Quadrupol).

4. Ein **Detektor** fängt Ionen auf und registriert Intensität und Entladungsströme.

5. Zuletzt erfolgt die digitale **Ausgabe** der gemessenen Daten.

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit Elektronensprüh-Ionisationsquelle.

2.7 Statistische Auswertung

Alle statistischen Abbildungen und Werte wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA) erarbeitet. Dargestellt sind Medianwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen. Unterschiede wurden, abhängig vom experimentellen Hintergrund, mit Hilfe eines gepaarten t-Tests, als auch mit einem ungepaarten t-Test festgestellt. Bei nichtparametrischer Verteilung kam es zur Verwendung des Tests von Mann und Whitney. Der Spearman Test diente der Bestimmung von Korrelationen. Der Proliferationsindex zur Auswertung der CFSE-Experimente setzte sich aus dem Verhältnis von behandelten Zellen zum Mittelwert der chemotherapeutisch unbehandelten Zellen zusammen, wobei letzterer gleich eins gesetzt wurde. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ sowie $R^2 > 0,5$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Humane B-Zellen unter Chemotherapie *in vivo*

Quantitative Veränderungen

Um die Funktion von B-Zellen und deren Veränderung in einem erweiterten Kontext zu betrachten, war zunächst die Bestimmung ihrer Anzahl notwendig. Für diesen Zweck wurden sowohl absolute als auch relative Zahlen der peripheren B-Zellen in Patienten mit PKH vor und nach ihrer Radiochemotherapie durchflusszytometrisch verglichen. Absolute Zahlen konnten mit Hilfe des Differentialblutbildes bestimmt werden, welches die gesamte Lymphozytenzahl beinhaltet. Im gesamten Patientenkollektiv zeigte sich eine signifikante Abnahme der absoluten und relativen B-Zellzahl unmittelbar nach der Therapie (**Abbildung 3**). In Patienten, die palliativ mit Methotrexat behandelt wurden, konnte dieser Effekt allerdings nicht nachgewiesen werden, der relative Anteil von B-Zellen blieb unverändert.

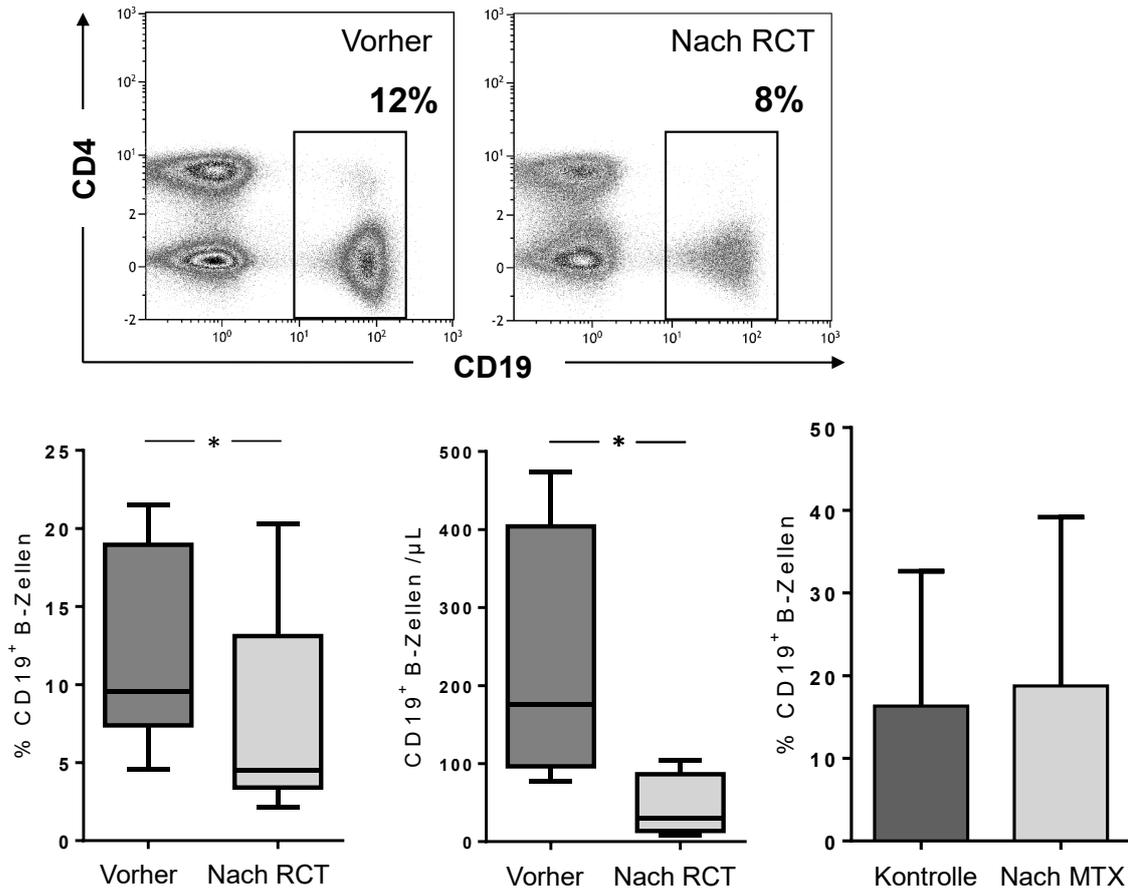
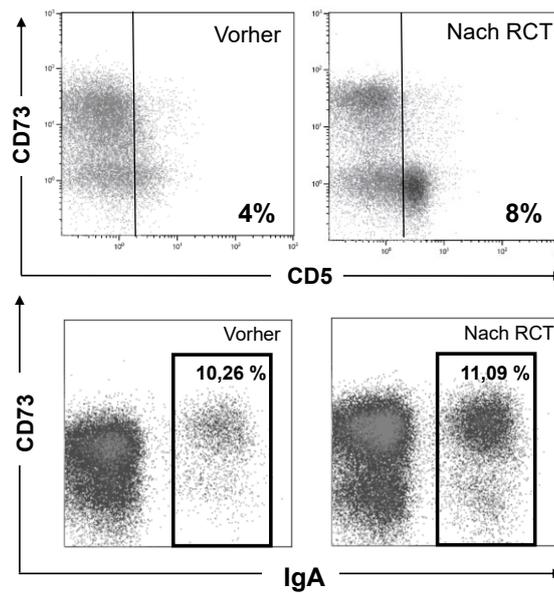


Abbildung 3: Der relative Anteil und die absolute Zahl $CD19^+$ B-Zellen nimmt bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignom nach einer Radiochemotherapie ab. Eine Dichteverteilung aus dem durchflusszytometrisch bestimmten Lymphozytenfenster zeigt in einem exemplarischen Patienten den Anteil an $CD19^+$ B-Zellen. Der mittlere Wert des relativen Anteils von 15 Patienten vor und nach Radiochemotherapie (RCT) ist angegeben. Die Frequenz und absolute Zahl von $CD19^+$ B-Zellen werden durch Boxplots dargestellt. Säulendiagramme dreier Patienten mit PKH vor und nach palliativer Methotrexat-Therapie (MTX) zeigen keinen Unterschied hinsichtlich der B-Zell-Frequenz. *: $p < 0,05$. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Phänotypische Veränderungen

Zur umfassenden Charakterisierung therapeutischer Einflüsse auf humane B-Zellen wurden PBMC der **Kohorte #1** einer FACS-Analyse unterzogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl der Anteil an CD19⁺IgM⁺-Zellen als auch der CD19⁺CD5⁺-Zellen sowie die durchschnittliche IgM-Expression auf B-Zellen nach der Behandlung signifikant zunahm (**Abbildung 4**). Der Vergleich mit den drei Patienten, die eine palliative Methotrexat-Therapie erhalten hatten, zeigte diese Veränderung nicht. Des Weiteren gingen aus FACS-Untersuchungen in der ersten Kohorte keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich den Oberflächenmarkern CD40, CD25, IgA, CCR7 und PD1 nach der Therapie hervor. Weder der prozentuale Anteil, noch die mittlere Fluoreszenzintensität änderten sich nach der Behandlung. CD26 wurde auf B-Zellen der Tumorpatienten nicht exprimiert und auch eine Chemotherapie bewirkte keine Expression.

4.1



4.2

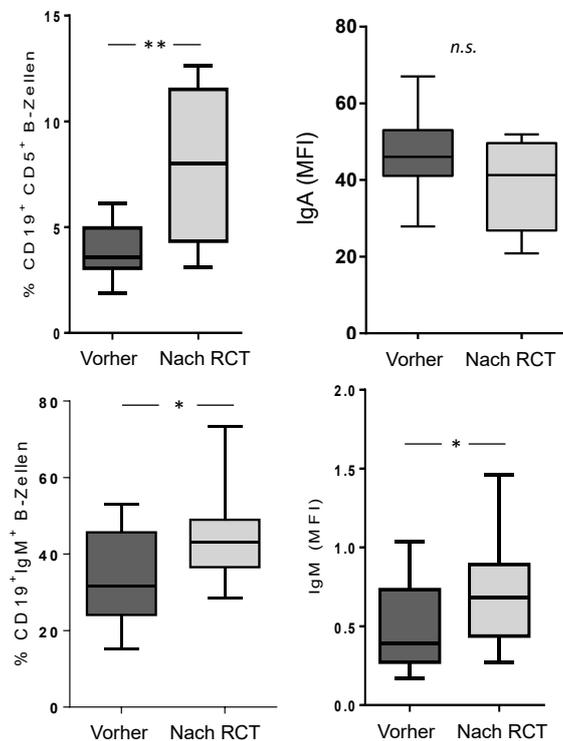


Abbildung 4: Eine Radiochemotherapie (RCT) verändert die Art der Oberflächenmarker auf B-Lymphozyten in Patienten mit Kopf-Hals-Malignom (PKH). 4.1: Beispielhafte Dichteverteilungen aus dem durchflusszytometrisch bestimmten Lymphozytenfenster zeigen CD5 und IgA positive B-Zellen. Der mittlere Wert des relativen Anteils von 15 Patienten mit PKH vor und nach RCT ist angegeben. 4.2: Gezeigt sind Boxplot-darstellungen der relativen Anteile beziehungsweise der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Oberflächenexpression von CD5, IgM und IgA auf humanen B-Lymphozyten in Patienten mit PKH. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Expression von Ektonukleotidasen

Eine genaue Charakteristik therapeutischer Einflüsse auf B-Lymphozyten im Hinblick auf ihre Adenosin-Produktion erfordert die Analyse der Ektonukleotidasen CD39 und CD73. Auf B-Zellen von 15 Patienten (Kohorte #1) mit aktiver Tumorerkrankung vor und nach chemotherapeutischer Behandlung wurde die Expression der beiden Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt (**Abbildung 5**). Kohorte #1 zeigte auf $68 \pm 9,7\%$ der B-Zellen eine Koexpression von CD39 und CD73. Analog zu den bereits aufgeführten Befunden nicht-isolierter B-Zellen war nach der RCT eine relevante Minderung der Frequenz und absoluten Zahl CD19⁺CD39⁺CD73⁺ Zellen zu verzeichnen. Verglichen mit den Messungen vor der Behandlung zeigte sich nach der RCT ein signifikanter Rückgang der CD39- ($p = 0,0002$), als auch der CD73-Expression ($p < 0,0001$). Infolgedessen verringerte sich auch der Anteil CD39 und CD73 positiver B-Zellen (**Abbildung 5.2**). Jedoch zeigte sich im Gegenzug hierzu nach der Therapie ein Anstieg der Populationen, die nur eine der beiden Ektonukleotidasen exprimieren. Die Zusammenschau der Befunde ergibt somit, dass CD39 und CD73 koexprimierende B-Zellen der stärksten Reduktion durch die mehrheitlich platinbasierte Chemotherapie unterliegen. Wiederum konnte dieser Effekt in den MTX-behandelten Patienten nicht nachgewiesen werden.

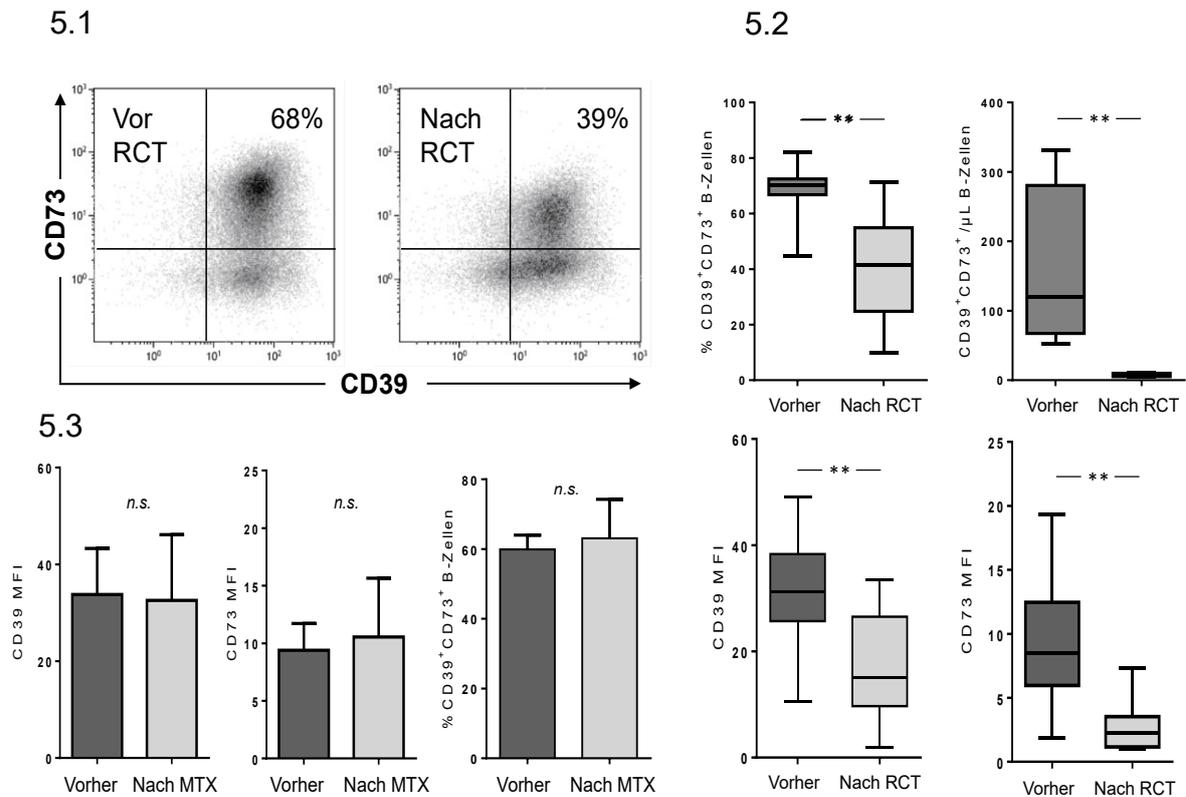


Abbildung 5: Die Expression von CD39 und CD73 auf CD19⁺ B-Lymphozyten sowie die absolute Anzahl CD39 und CD73 positiver B-Zellen nimmt bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignom nach einer Radiochemotherapie (RCT) ab. 5.1: Ein Dichtediagramm aus dem durchflusszytometrisch bestimmten CD19⁺ Fenster zeigt den Anteil an CD39⁺ und CD73⁺ B-Lymphozyten. Der mittlere Wert des relativen Anteils von 15 Patienten mit PKH vor und nach RCT ist angegeben. 5.2: Gezeigt ist die Frequenz und absolute Zahl von CD19⁺CD39⁺CD73⁺ Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Oberflächenmarker CD39 und CD73 mit Hilfe von Boxplotdarstellungen. 5.3: Säulendiagramme mit Standardabweichungen dreier Patienten mit PKH vor und nach palliativer Methotrexat-Therapie (MTX) zeigen keinen Unterschied hinsichtlich der Frequenz und MFI von CD39 und CD73 auf B-Lymphozyten. **: $p < 0,01$, n.s.: nicht signifikant. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Langzeiteffekte

Die gewonnenen Erkenntnisse aus Kohorte #1 wurden durch eine zweite Kohorte ergänzt, deren Blutentnahme im Mittel $14,2 \pm 7$ Monate nach abgeschlossener RCT erfolgte und somit Rückschlüsse auf die Langzeiteffekte der Therapie erlaubte. Wiederum wurden die Ergebnisse mit gesunden Probanden verglichen. **Abbildung 6** zeigt, dass sich im Gegensatz zur ersten Kohorte, die Frequenz der B-Zellen nach RCT erhöht darstellte. Die Höhe der Frequenz korrelierte signifikant mit dem zeitlichen Abstand zur RCT, was auf eine zahlenmäßige Erholung der B-Zellen nach der RCT schließen lässt. Die **Abbildungen 3** und **6** veranschaulichen, dass die relative Anzahl von B-Zellen zunächst zwar abnimmt, sich aber im Verlauf erholt und deutlich anwächst. Die bereits erhobenen Befunde bezüglich der Erniedrigung von CD39 ($p=0,01$) und auch CD73 ($p<0,01$) auf B-Lymphozyten ließen sich in dieser Kohorte bestätigen. Verglichen mit gesunden Probanden kann demzufolge von einer dauerhaften Mindereexpression ausgegangen werden.

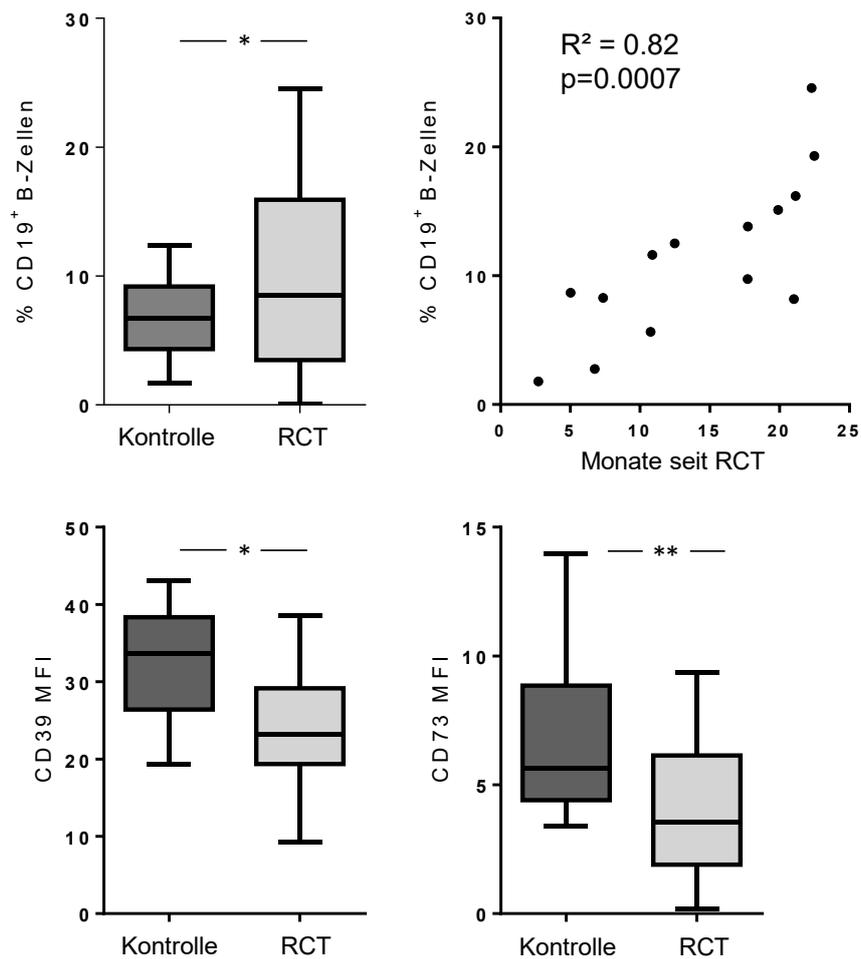


Abbildung 6: Der Anteil an B-Lymphozyten steigt nach zurückliegender Radio-chemotherapie (RCT) kontinuierlich an, während die Expression der Ektonukleotidasen in reduziertem Zustand verbleibt. Boxplotdarstellungen zeigen die B-Zell-Frequenz und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD39 und CD73. Die zweite Patientenkohorte, bestehend aus 14 Patienten mit Tumor im Kopf-Hals-Bereich und seit 2 bis 23 Monaten zurückliegender RCT, wird mit 24 gesunden Spendern verglichen. Ein Punktediagramm stellt den zeitlichen Verlauf der Frequenz von B-Zellen nach RCT dar. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, R^2 : Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

3.2 Humane B-Zellen unter Chemotherapie *in vitro*

Oberflächenexpression der Ektonukleotidasen

Zur Behandlung des fortgeschrittenen PKH stehen neben der Chirurgie und Bestrahlung verschiedene chemotherapeutische Regime zur Verfügung. Im klinischen Alltag gebräuchliche Zytostatika wurden verwendet, um *in vitro* Einflüsse auf Adenosin-produzierenden B-Zell-Populationen zu überprüfen. Zunächst wurden die beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73 auf isolierten Zellen gesunder Probanden nach Gabe steigender Zytostatika-Dosierungen und siebentägiger Zellkultur untersucht (**Abbildung 7** und **Abbildung 8**). Verglichen mit Kontrollen derselben Spender, die keinen Zytostatika ausgesetzt wurden, kam es ab einer Dosis von jeweils 5 µg/ml oder höher unter Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU zu reduzierten CD39-Expressionsraten. MTX hingegen rief die entgegengesetzte Reaktion hervor und führte sowohl in niedriger (1 µg/ml) als auch in erhöhter Dosierung (5 µg/ml) zu einer signifikanten Überexpression. Abweichend von den Beobachtungen der beiden Patientenkohorten nahm die Darstellung von CD73 auf mit Cisplatin behandelten B-Zellen nicht ab, sondern ab einer Dosis von 5 µg/ml zu. Paclitaxel bewirkte eine vergleichbare Reaktion bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml. MTX und 5-FU zeigten keine Wirkung auf die Oberflächenexpression von CD73. Versuchsreihen mit Cetuximab führten weder bei CD39 noch bei CD73 zu Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensität.

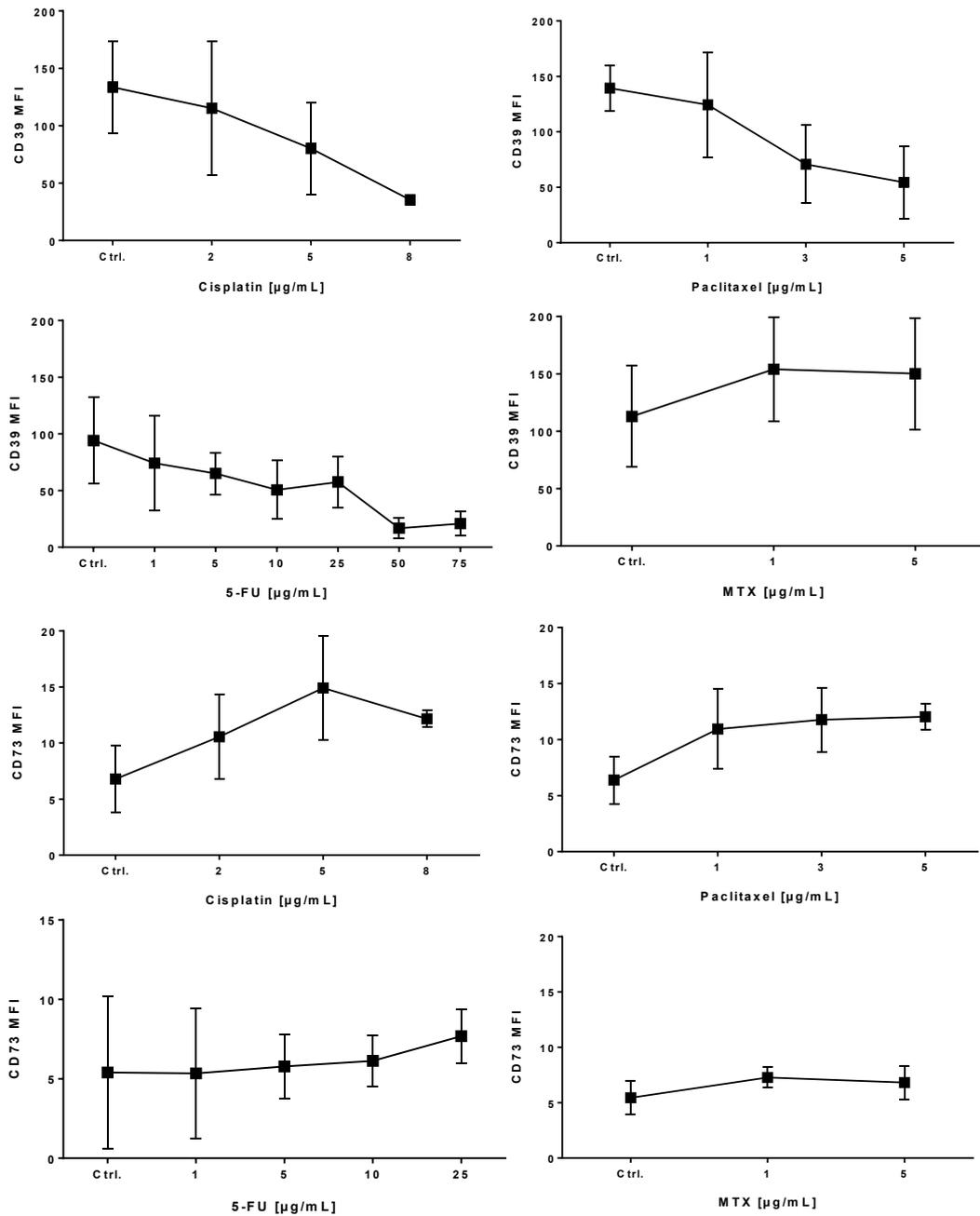


Abbildung 7: Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU reduzieren die Expression von CD39 auf humanen B-Zellen *in vitro*, während diese durch MTX erhöht wird. CD73 wird nach Behandlung mit Cisplatin und Paclitaxel *in vitro* vermehrt exprimiert. Isolierte B-Zellen gesunder Spender wurden mit Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), Paclitaxel oder Methotrexat (MTX) behandelt, mit Hämagglutinin, Interleukin-4 und CD40-Ligand stimuliert und für 7 Tage kultiviert. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Bestimmung der CD39-Expression durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) nach Cisplatin-, Paclitaxel-, 5-FU- und Methotrexat-Behandlung verglichen mit Kontrollproben (Ctrl.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

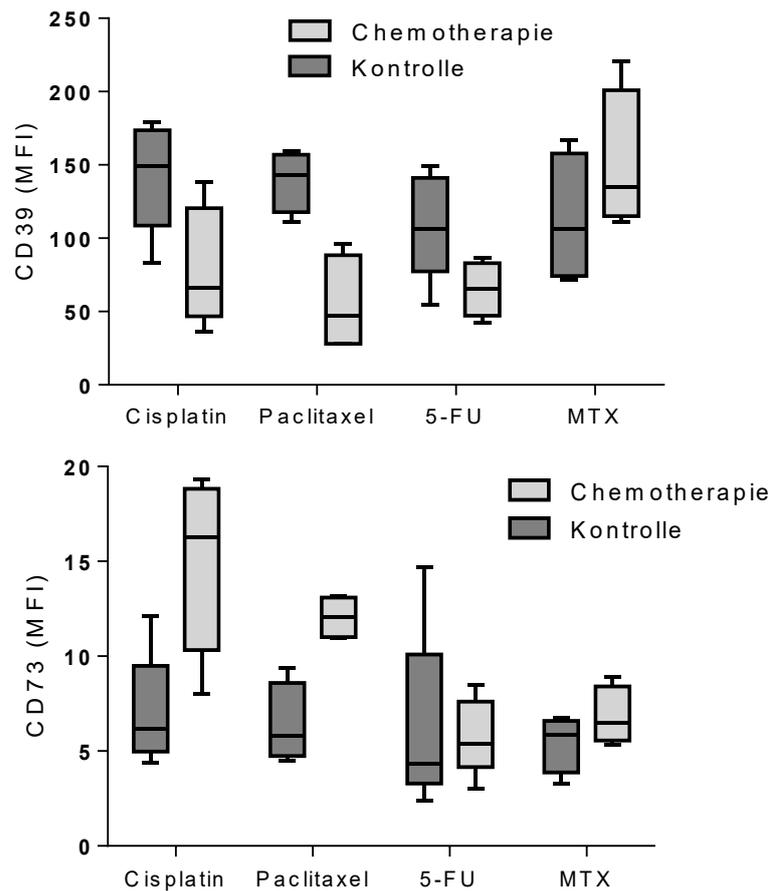
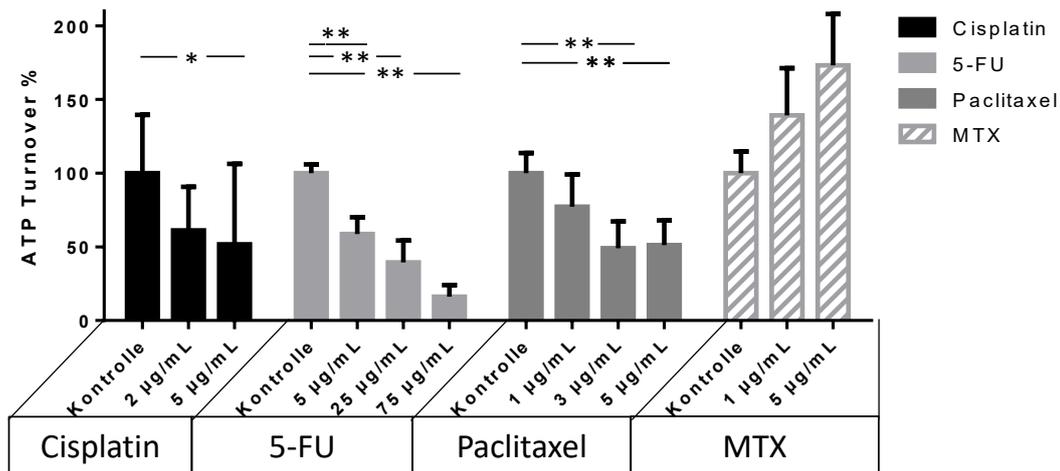


Abbildung 8: Isolierte B-Zellen gesunder Spender wurden mit Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), Paclitaxel oder Methotrexat (MTX) behandelt, mit Hämagglutinin, Interleukin-4 und CD40-Ligand stimuliert und für 7 Tage kultiviert. Eine durch Boxplots dargestellte Nebeneinanderreihung gleicher Konzentrationen (5 µg/ml) des jeweils verwendeten Zytostatikums weist Verlaufsunterschiede verglichen mit Kontrollproben der jeweiligen Spender auf. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Hydrolyse von ATP

Der Verbrauch von ATP durch B-Zellen und damit der indirekte Nachweis für die CD39-Aktivität wurde mittels Lumineszenz gemessen. Isolierte B-Zellen gesunder Probanden wurden mit jeweils einem der untersuchten Zytostatika behandelt und kultiviert. Nach 90-minütiger Inkubationszeit wurde das verbliebene extrazelluläre ATP gemessen. Wie in **Abbildung 9** gezeigt, wurde hierbei ersichtlich, dass mit 5 µg/ml Cisplatin inkubierte Zellen eine signifikante Reduktion des ATP-Verbrauchs aufweisen. 5-FU führte mit allen verwendeten Konzentrationen (5, 25 und 75 µg/ml) zu einer Abnahme des Verbrauchs und auch Paclitaxel reduzierte den ATP-Umsatz ab einer Konzentration von 3 µg/ml. MTX zeigte auch hinsichtlich des ATP-Verbrauchs eine Divergenz verglichen mit den aufgeführten Änderungen. Nach der Gabe von Methotrexat wurden keine signifikant geringeren ATP-Mengen ermittelt, jedoch ein tendenziell erhöhter ATP-Verbrauch beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen CD39-Expression und ATP-Umsatz konnte durch die Korrelation der beiden Faktoren ($p < 0,0001$) nachgewiesen werden (**Abbildung 9.2**). Insbesondere Paclitaxel führte zu einer dosisabhängigen Reduktion von CD39 und des ATP-Verbrauchs.

9.1



9.2

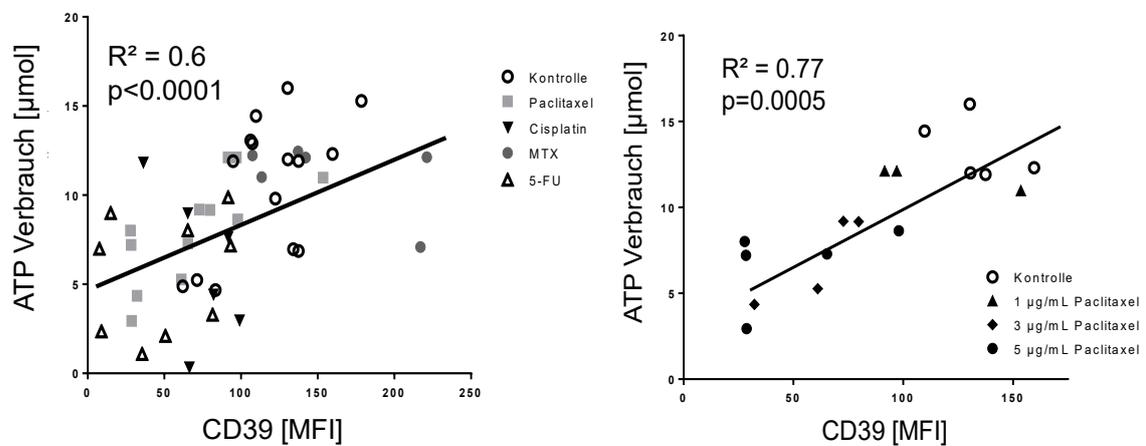


Abbildung 9: Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU senken den extrazellulären ATP-Umsatz, welcher mit dem Oberflächenmarker CD39 auf humanen B-Lymphozyten korreliert. Isolierte B-Zellen gesunder Spender wurden mit Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), Paclitaxel oder Methotrexat (MTX) behandelt, mit Hämagglutinin, Interleukin-4 und CD40-Ligand stimuliert und für 7 Tage kultiviert. 9.1: Gezeigt ist die Lumineszenz-Analyse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels Säulendiagrammen und Standardabweichungen. Kontrollen enthielten keine Zytostatikum-Beimengung. Der extrazelluläre ATP-Verbrauch wurde nach Hinzugabe von 20 µmol ATP nach 90 Minuten quantifiziert. Der mittlere ATP-Verbrauch unbehandelter B-Zellen wurde gleich 100% gesetzt. 9.2: Die Korrelation zwischen ATP-Umsatz und CD39-Expression auf B-Zellen wird durch Punktediagramme veranschaulicht. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität, R^2 : Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Nachweis von Purinderivaten in der Massenspektrometrie

Die in der Lumineszenz nachgewiesenen funktionellen Veränderungen der B-Zellen wurden exemplarisch mittels Massenspektrometrie bestätigt. Zellüberstände isolierter B-Lymphozyten wurden nach einstündiger Inkubation mit extrazellulären ATP auf den Gehalt von 5'-AMP, Adenosin und Inosin untersucht. Letztere stellen Stoffwechselprodukte des ATP dar und haben aufgrund der immunsuppressiven Wirkung von 5'-AMP und Adenosin einen hohen Stellenwert für diese Arbeit. **Abbildung 10** zeigt die jeweilige Oberflächen-Expression von CD39 und CD73, den dazugehörigen ATP-Verbrauch und den massenspektrometrisch ermittelten Gehalt an Purinderivaten von B-Zellen eines repräsentativen Spenders an. Cisplatin ausgesetzte B-Lymphozyten exprimierten weniger CD39 auf ihrer Zelloberfläche, verbrauchten weniger ATP und produzierten auch weniger 5'-AMP, Adenosin und Inosin als unbehandelte B-Zellen desselben Spenders. Aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten zeigte sich nur eine Tendenz zur verringerten Adenosin-Produktion in Cisplatin-behandelten Zellen, jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0.07$). Paclitaxel führte ebenfalls zu einer geringeren Produktion von Adenosin und Inosin. Eine Abnahme der 5'-AMP-Produktion trat durch eine erhöhte Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Paclitaxel ein. Anders als CD39 zeigten die Expressionsraten von CD73 keinen Bezug zur Adenosin-Produktion, da diese auch von der Konzentration des Substrates 5'-AMP abhängig ist. Auch die Produktion der ATP-Derivate lässt in diesem Zusammenhang auf eine geringfügigere Abhängigkeit von CD73 schließen. MTX in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ führte im Einklang mit den Daten der CD39-Expression und des ATP-Umsatzes zu einer erhöhten Produktion von 5'-AMP, Adenosin und Inosin.

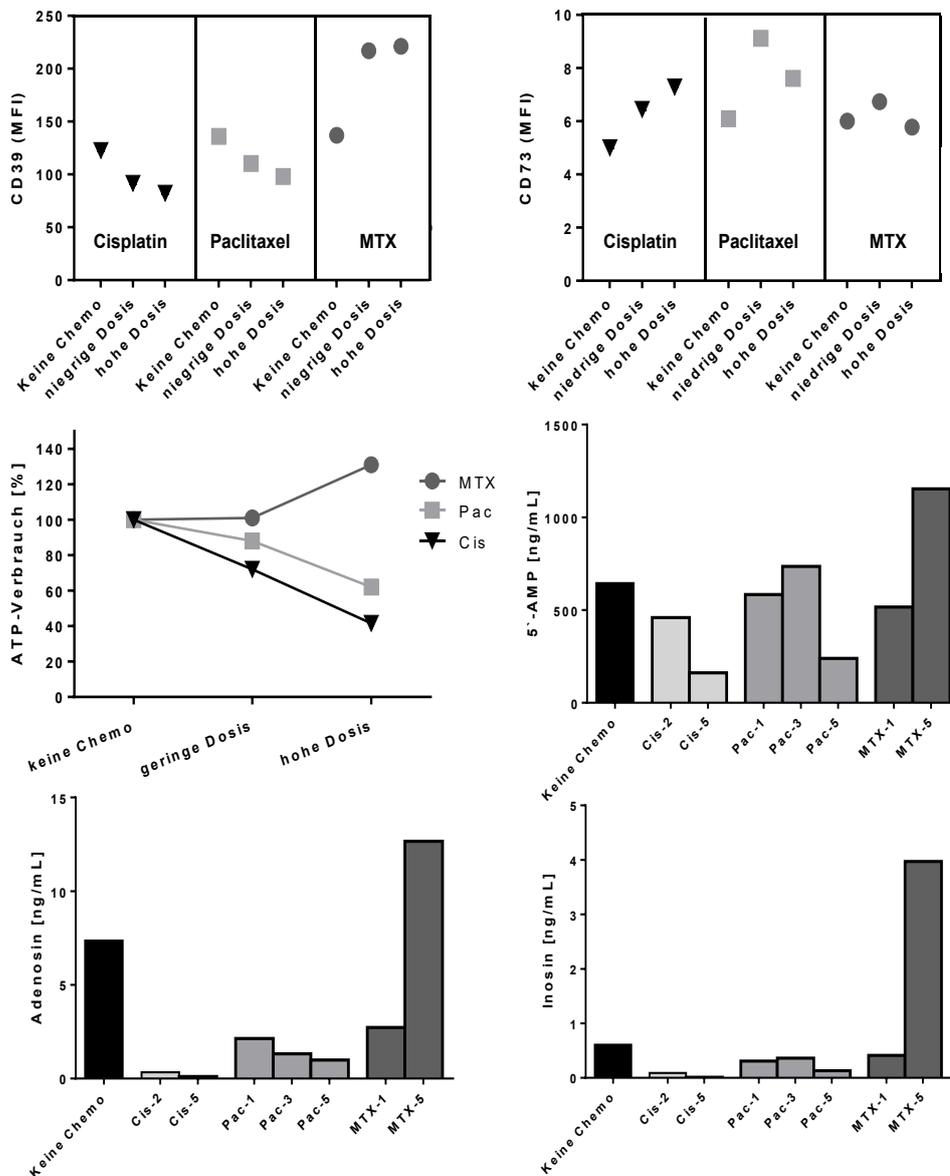
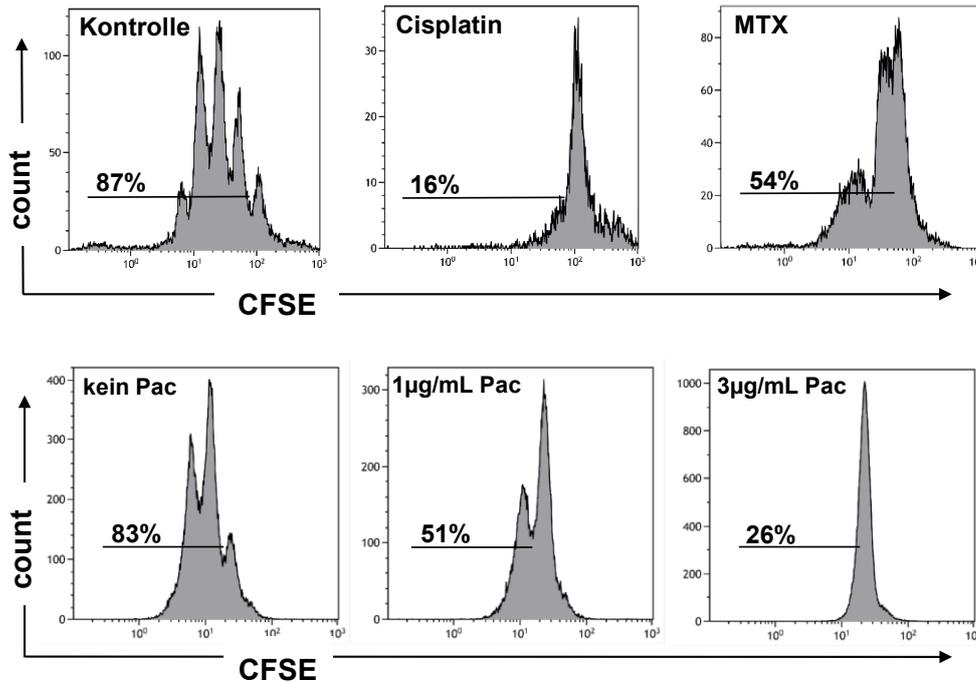


Abbildung 10: Der B-Zell-Phänotyp, die ATP-Hydrolyse und die Produktion der Purinderivate 5'-AMP, Adenosin und Inosin stehen in direkten Bezug zueinander und werden durch eine Chemotherapie beeinflusst. Isolierte B-Zellen, jeweils eines repräsentativen Spenders, wurden mit Hämaggglutinin, Interleukin-4 und CD40-Ligand stimuliert und mit jeweils 1 µg/mL (niedrige Dosis) beziehungsweise 5 µg/mL (hohe Dosis) eines Zytostatikums behandelt und für 7 Tage kultiviert. Gezeigt ist die FACS-Analyse der CD39-Expression nach Cisplatin-, Paclitaxel- und Methotrexat-Behandlung (MTX). Der extrazelluläre ATP-Verbrauch wurde nach Hinzugabe von 20 µmol ATP nach 90 Minuten indirekt über ein Lumineszenzverfahren quantifiziert. Der mittlere ATP-Verbrauch un behandelter B-Zellen wurde gleich 100% gesetzt. Entsprechend dem Phänotyp und ATP-Verbrauch zeigen Säulendiagramme das gemessene 5'-AMP, Adenosin und Inosin, welche massenspektrometrisch aus den Probeüberständen des jeweiligen Spenders ermittelt wurden. Die Ziffern geben die jeweils verwendete Konzentration des Zytostatikums in µg/ml wieder. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität, Cis: Cisplatin, Pac: Paclitaxel. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

Proliferation humaner B-Zellen

Da für die Behandlung des PKH mehrere antineoplastische Therapieformen zur Verfügung stehen, sind besonders Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung auf immunologische Zellen von Bedeutung. Eine FACS-Analyse von CFSE-gefärbten B-Lymphozyten erlaubte es, Tochtergenerationen zu identifizieren und Rückschlüsse auf Proliferationsraten zu ziehen, indem Zellen, die mit einem Zytostatikum inkubiert wurden, unbehandelten Zellen gegenübergestellt wurden. Erwartungsgemäß bewirkte eine Beimengung von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel eine signifikante Verringerung der Proliferation humaner B-Zellen. Allerdings führte MTX diese Verringerung in keinem vergleichbaren Ausmaß herbei, wie **Abbildung 11** aufzeigt. Darüber hinaus kam es durch Paclitaxel zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellproliferation.

11.1



11.2

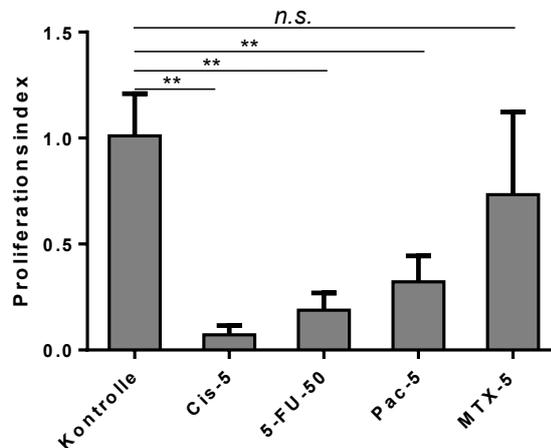


Abbildung 11: Methotrexat bewirkt im Gegensatz zu Cisplatin, Paclitaxel und 5-Fluorouracil (5-FU) keine signifikante Reduktion der Proliferation von B-Lymphozyten. Ein auf Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester-basiertes Proliferationsassay (CFSE) zeigt die Proliferationsrate von humanen B-Zellen nach 7 Tagen. Alle Versuchsreihen enthielten Hämagglutinin, Interleukin-4 und CD40-Ligand zur Wachstumsstimulation. 11.1: Repräsentative FACS-Analysen stellen Proliferationsraten prozentual dar. Der Zusatz von Cisplatin (Cis) veranlasste, anders als die Beigabe von Methotrexat (MTX), eine Unterbrechung der B-Zell-Proliferation. Paclitaxel (Pac) führt eine dosisabhängige Wachstumsverringerng herbei. 11.2: Säulendiagramme repräsentieren die Proliferation der Zellen im Verhältnis zu Kontrollen ohne Zytostatikum-Beimengung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Ziffern geben die jeweils verwendete Konzentration des Zytostatikums in µg/ml wieder. **: $p < 0,01$, n.s.: nicht signifikant. Erstveröffentlichung in Ziebart et al. [86].

3.3 Humane T-Zellen unter Chemotherapie

Adenosin-produzierende T-Lymphozyten

Die Funktion und Beeinträchtigung humaner T-Lymphozyten im Rahmen einer antineoplastischen Therapie war für diese Arbeit ebenfalls von Interesse, da durch diese auf vielfältige Weise eine immunologische Tumorbekämpfung erfolgt. Ein T-Lymphozyt verfügt zwar nicht über beide Ektonukleotidasen, ist jedoch in der Lage entweder CD39 oder CD73 auf seiner Oberfläche zu exprimieren und damit einzelne Schritte der extrazellulären 5'-AMP- und Adenosin-Bildung durchzuführen. Wie in der **Abbildung 12** gezeigt, stieg bei Patienten der Kohorte #1 der Anteil CD4⁺CD39⁺ T-Zellen im Mittel von $12,6 \pm 5,1\%$ auf $23 \pm 11,6\%$ ($p < 0,0001$). Die CD4⁺CD39⁺ T-Zellpopulation kann weiter in CD4⁺CD39⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) und CD4⁺CD39⁺CD25⁻ T-Zellen unterteilt werden. Für beide Zellpopulationen ergab sich nach einer Chemotherapie eine signifikante Zunahme ($p = 0,0031$; $p = 0,002$). Der Anteil CD4⁺CD39⁺CD26⁺ T-Zellen nahm ebenfalls im Mittel von $3,5 \pm 2,6\%$ auf $7,5 \pm 5,6\%$ nach der RCT zu ($p = 0,0002$). Eine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil CD4 positiver und dessen CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T-Zellen nach RCT konnte nicht gezeigt werden. Weder der mit $3 \pm 1,6\%$ bereits im Vorfeld gering ausgeprägte Anteil an CD4⁺CD73⁺ T-Zellen noch die mittlere Expression von CD73 auf CD4⁺ T-Zellen änderte sich signifikant nach der Therapie.

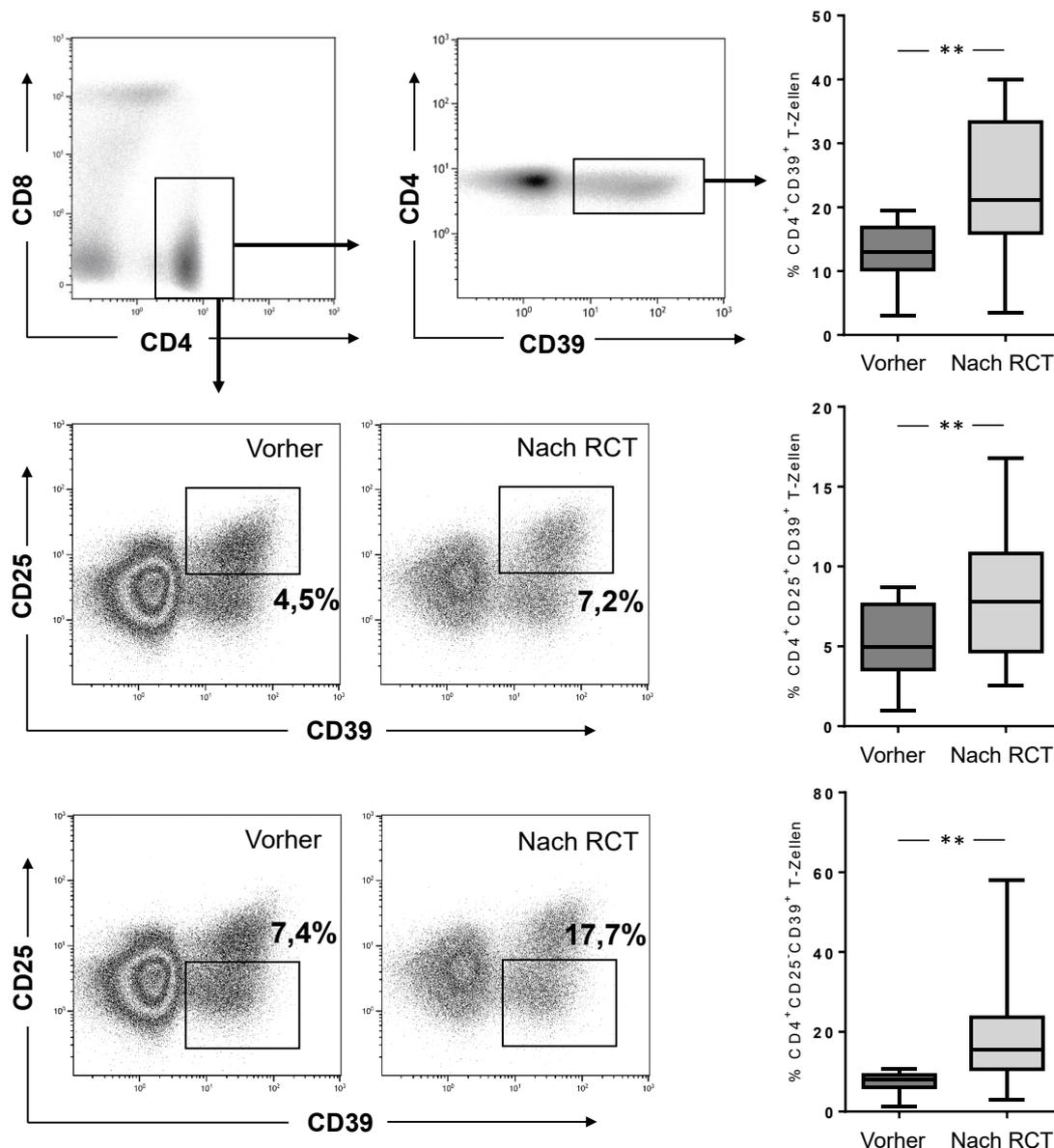


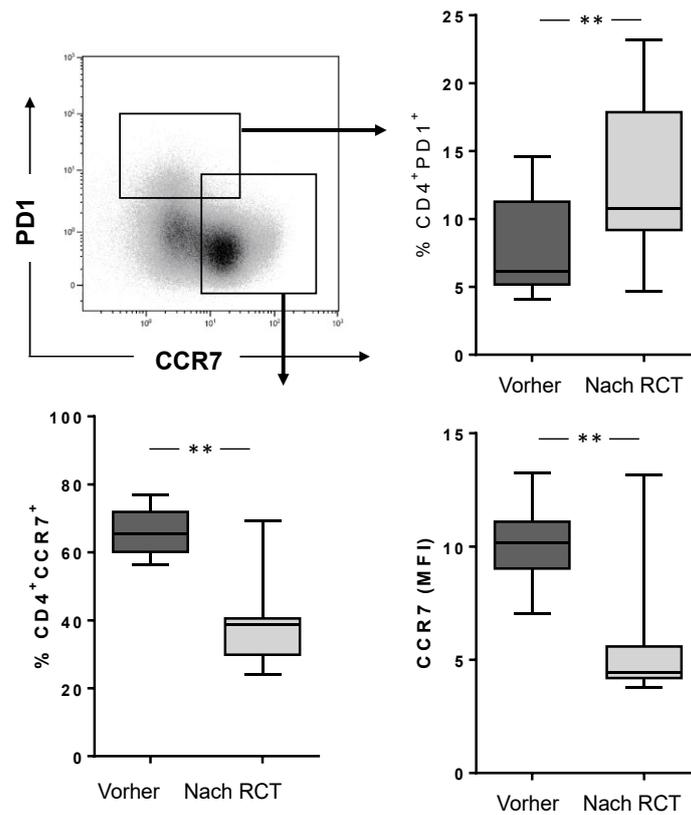
Abbildung 12: Veränderung CD39 positiver T-Helfer-Zellen durch eine Radiochemotherapie (RCT). Die RCT bewirkt eine Erhöhung des Anteils an regulatorischen und an der Gesamtzahl an CD4⁺ CD39⁺ T-Lymphozyten. Ein Lymphozytenfenster aus der Mehrfarben-Durchflusszytometrie zeigt exemplarisch die Auswahl und weitere Analyse der CD4⁺ Lymphozyten. Ein repräsentatives Fenster stellt den relativen Anteil CD39⁺ T-Zellen von 15 Patienten mit Kopf-Hals-Malignom dar. Zusätzlich zeigt eine Boxplot-Darstellung die Untersuchung der Patienten vor und nach ihrer Therapie. Sowohl regulatorische CD25 positive als auch CD25 negative Zellanteile nahmen nach der RCT zu. Gezeigt sind die Mittelwerte der 15 Patienten in einer repräsentativen FACS-Analyse und dazugehörige Boxplot-Darstellungen. **: p < 0,01.

PD-1- und CCR7-Expression auf T-Lymphozyten

Die FACS-Analyse der Patienten mit PKH ergab, dass die Expression des Zelloberflächenrezeptors PD-1 auf CD25⁺CD39⁺ regulatorischen T-Zellen sowie der Gesamtheit CD39 exprimierender T-Lymphozyten keiner signifikanten Veränderung unterliegt, nachdem die Patienten eine RCT erhalten hatten. Jedoch exprimierten im Mittel nur $6,3 \pm 3,8\%$ der CD25⁺ T-Zellen sowohl CD39 als auch PD-1. Anders verhielt es sich mit der Rezeptoranzahl auf der Gesamtheit der CD4 positiven Lymphozyten. Hier war ein deutlicher Anstieg ($p = 0,0004$) PD-1⁺ Zellen zu sehen (**Abbildung 13.1**). Die RCT führte auch zu einer Abnahme des Zellanteils, welcher CCR7 exprimierte ($p < 0,0001$) sowie der MFI ($p = 0,0001$) auf CD4⁺ T-Lymphozyten. Eine Koexpression von PD-1 und CCR7 war auf $1,9 \pm 0,7\%$ der CD4⁺ T-Zellen der Tumorpatienten zu ermitteln und blieb von der Therapie unbeeinflusst.

Auch die in **Abbildung 13.2** dargestellten CD8 positiven Lymphozyten aus dem Verband der peripheren, mononukleären Zellen zeigten dieses Phänomen. In Patienten mit PKH ließ sich deutlich eine CD8⁺CCR7⁺ Häufigkeitsverteilung von einer CD8⁺CCR7⁻ abgrenzen. Der Anteil ersterer war nach der RCT reduziert vorzufinden. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen keine Veränderung des PD-1 Rezeptors auf CD8⁺ T-Zellen. CD8 positive Lymphozyten zeigten keine bedeutsame Koexpression von CCR7 und PD1.

13.1



13.2

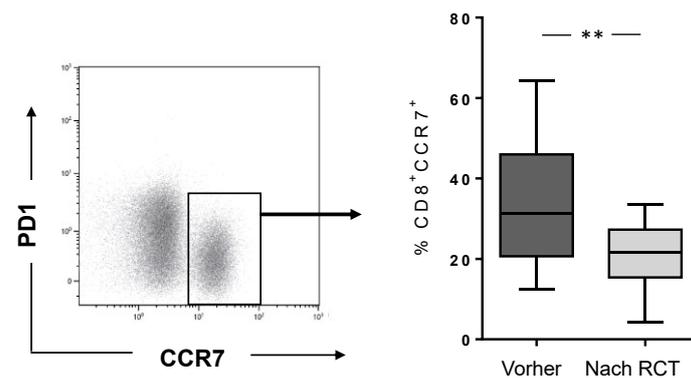


Abbildung 13: Eine Radiochemotherapie (RCT) führt zu einer Änderung der Anzahl an PD-1- und CCR7-Rezeptoren auf T-Lymphozyten in Patienten mit Kopf-Hals-Malignom (PKH). 15 Patienten mit PKH wurden hinsichtlich der Expression von PD-1 und CCR7 auf T-Lymphozyten einer FACS-Analyse unterzogen. 13.1: Gezeigt ist ein repräsentatives Fenster der Dichteverteilung bereits eingegrenzter CD4⁺ T-Lymphozyten. Boxplots zeigen eine Zunahme (PD-1) und eine Abnahme (CCR7) des relativen Anteils der Zellpopulationen sowie eine Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR7. 13.2: Dargestellt wird die weitere Unterteilung CD8⁺ Lymphozyten in eine CCR7 negative und positive Zellpopulation. Letztere unterliegt einer signifikanten Reduktion, welche mit Hilfe von Boxplots abgebildet ist. **: p < 0,01.

4. Diskussion

Die Auswirkungen einer systemischen Tumorthherapie auf das Immunsystem sind von großer Bedeutung, da der Erfolg der Behandlung von einem intakten Immunsystem profitiert. Allerdings ist die Funktion regulatorischer B-Zellen nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Adenosin-Produktion eine immunsuppressive Wirkung im Tumormikromilieu erzielt. Die aufgezeigten Veränderungen der Zelloberflächenmarker und deren Adenosin-Produktion durch die Chemotherapie müssen in bereits vorhandene Kenntnisse über die Tumorentstehung und Behandlungserfolge eingeordnet werden. Hierfür könnte die Balance zwischen immunstimulierenden ATP und ADP sowie inhibierendem Adenosin ein wichtiger Faktor sein. Das Oberflächenenzym CD39 stellt daher einen entscheidenden Regulator von einer proinflammatorischen hin zu einer antiinflammatorischen Reaktion dar [18]. Folglich spielt auch die extrazelluläre Umwandlung von Adenosin zu Inosin durch das Enzym Adenosin-Desaminase, welches an das Oberflächenprotein CD26 gebunden ist, eine Rolle für dieses Gleichgewicht [34].

4.1 Auswirkungen von Cisplatin auf B-Zellen

Sowohl in zwei unabhängigen Patientenkohorten als auch *in vitro* konnte eine Abnahme der B-Zellfrequenz und der Expression der Ektonukleotidasen CD39 und CD73 nach einer Behandlung mit Cisplatin bzw. mit Carboplatin gezeigt werden. Fehlende Einflussfaktoren *in vitro* lassen darauf schließen, dass CD39⁺ B-Zellen entweder sensibler gegenüber einer Chemotherapie sind oder das Protein unter chemotherapeutischem Einfluss vermindert gebildet wird.

Tumore ziehen aus der immunsuppressiven Funktion von Adenosin einen Vorteil. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine verminderte Aktivität der beiden Ektonukleotidasen ebenfalls mit einem verringerten Tumorwachstum einhergeht [32,65,82]. Gleichzeitig wird die vermehrte Bildung von CD73 mit einem erhöhten Risiko für Metastasen und einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie assoziiert [38,40,62]. Die vermehrte Expression von CD73 könnte eine physiologische Maßnahme sein, um Abbauege für die vermehrt anfallenden Purine im Tumorumfeld zu stärken, was sich jedoch nachteilig für die Bekämpfung der Tumorzellen auswirkt [64]. Demzufolge könnte die gezeigte Mindereexpression

von CD73 nach einer RCT dem entgegenwirken, verbleibt aber, in Anbetracht der fehlenden Reproduktion der Resultate durch Cisplatin *in vitro*, in ihrer Ursache unklar.

Andere Studien führen auf, dass Adenosin durch intrazelluläre und extrazelluläre Prozesse zu einer Apoptose von Tumorzellen führen kann [3,55,73]. Die vielfältigen Konsequenzen der erhöhten oder erniedrigten Aktivitäten der Ektonukleotidasen beschränken sich nicht auf die Proliferation von T-Zellen. Weitere Folgen, wie die geringere Rekrutierung von Leukozyten und die fehlende Kommunikation von Langerhans Zellen, müssen in Betracht gezogen werden, sollte eine Inhibition der CD39-Aktivität beabsichtigt werden [45].

Eine platinbasierte Chemotherapie hat nicht nur durch die Verringerung der beiden Ektoenzyme einen schmälernden Effekt auf die Adenosin-vermittelte Immunsuppression. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Platine über eine Reduktion von PD-L2 auf Tumorzellen und dendritischen Zellen, die Aktivität letzterer erhöhen, während immunsuppressive Funktionen von Tumorzellen geschwächt werden [37].

Eine systemische Therapie hat außerdem unterschiedliche Auswirkungen auf regulatorische Lymphozytenpopulationen. So konnte in der ersten Kohorte eine reduzierte Frequenz und absolute Anzahl der B-Zellen nachgewiesen werden. Die zweite Patientenkohorte zeigt, dass sich die B-Zellpopulation etwa ein Jahr nach Abschluss der Behandlung vollständig erholt hat. Im Gegensatz dazu bleibt, als Folge einer Reduktion der absoluten Anzahl CD4 positiver Zellen, die Frequenz regulatorischer T-Zellen über einen Zeitraum von mindestens drei Jahren nach einer abgeschlossenen Radiochemotherapie erhöht [56]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass eine RCT sich zwar auf beide Lymphozyten-Untergruppen auswirkt, CD4⁺ Zellen jedoch langfristig stärker betroffen sind und sich B-Zellen bedeutend schneller erholen.

Daten für eine bereits beschriebene Expression von PD-1 auf B-Zellen konnten nicht reproduziert werden. Thibult et al. zeigten unterschiedlich ausgeprägte Expressionen von PD-1 auf naiven B-Zellen sowie B-Gedächtniszellen im peripheren Blut und in Lymphknoten, deren Aktivierung und Proliferation über den PD-1-Rezeptor Signalweg gefördert werden konnte [71]. Die fehlende Reproduktion könnte an der mangelnden Aktivierung, der veränderten

Immunzellinteraktionen in Patienten mit PKH oder an den Einflüssen einer Chemotherapie liegen.

Die weitere Beobachtung der vorgefundenen Erhöhung der CD5⁺ B-Zell-Population scheint im Hinblick auf das Tumorwachstum empfehlenswert. Eine Radiochemotherapie führte bei Patienten mit PKH zu einem signifikanten Anstieg der CD5-Expression auf der B-Zell-Population. Diese CD5⁺ Subgruppe wird nicht nur vermehrt in Tumor-infiltrierenden B-Zellen gefunden, sondern zeigte auch, im Gegensatz zu CD5⁻ B-Zellen, eine verstärkte Tumorentwicklung in Mausmodellen auf [84]. Die durch Zhang et al. beschriebene Bindung von CD5 an IL-6 könnte somit durch eine RCT gefördert werden und das Tumorwachstum begünstigen.

Erhöhte Expressionsraten von IgM auf der Zelloberfläche wurden bereits bei immunsuppressiven, IL-35 sezernierenden B-Zellen vorgefunden, welche *in vivo* während Infektionen und Autoimmunerkrankungen auftraten [63]. Demzufolge sind weitere Untersuchungen zur Zytokinsekretion der B-Zellen wünschenswert. Eine systemische Therapie könnte die antitumorale Immunantwort durch die Induktion immunsuppressiver Zytokine behindern.

4.2 Effekte von Methotrexat auf B-Zellen

Patienten zeigten nach einer palliativen MTX-Behandlung, im Gegenteil zu den beschriebenen Veränderungen nach einer platinbasierten Therapie, keine signifikanten Änderungen hinsichtlich der Expression der beiden Ektonukleotidasen. Die *in vitro* behandelten B-Zellen wiesen überdies eine verstärkte CD39-Expression auf. Der Unterschied zwischen den Resultaten, die eine MTX-Therapie *in vivo* und *in vitro* verursachte, könnte dadurch erklärt werden, dass *in vitro* eine zusätzliche Stimulation durch einen CD40-Ligand und durch IL-4 stattgefunden hatte, wodurch vornehmlich diejenigen B-Zellen proliferierten, die verstärkt CD39 exprimierten [24]. Methotrexat wird in geringerer Dosis als antiinflammatorisches Mittel auch regelmäßig bei chronisch entzündlichen Erkrankungen angewandt, wie etwa bei der rheumatischen Arthritis. Dem immunsuppressiven Wirkmechanismus wird eine Beteiligung von Adenosin zugeschrieben, jedoch ist dieser bisher nicht hinreichend beschrieben [70]. So zeigten Arbeiten, dass antagonistisch wirkendes Koffein über Adenosin-Rezeptoren die Effekte von Methotrexat einschränkte und Nebenwirkungen vermied [42,70]. Eine erhöhte Bildung des Ektoenzym unter Methotrexat erklärt

unter anderem dessen antiinflammatorische Wirkungsweise und bestärkt dessen Wertigkeit im Hinblick auf Autoimmunerkrankungen. Darüber hinaus konnten weitere Zusammenhänge einer Methotrexat-Therapie und Adenosin aufgezeigt werden. So korreliert ein Polymorphismus des Adenosin-Rezeptors A2A mit einer von Methotrexat ausgelösten Leukenzephalopathie [74]. Für die Suppression von NF-kappaB durch Methotrexat und eine damit einhergehende antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung wird ebenfalls das Ausschütten von Adenosin verantwortlich gemacht und auch im Umfeld von Glioblastomzellen bewirkte Methotrexat ein erhöhtes Aufkommen von Adenosin durch die vermehrte Expression von CD73 [23,41]. Ob eine derartige Immunsuppression im Tumorumfeld des PKH einen Nachteil darstellt, ist nicht abschließend geklärt. Nicht zuletzt dadurch, scheint eine Übertragung von Erkenntnissen aus Studien über autoimmune Prozesse nur teilweise möglich.

4.3 Einfluss einer Radiochemotherapie auf T-Zellen

Die Ektoenzyme CD39 und CD73 stellen nicht nur Oberflächenmarker für regulatorische T-Zellen dar, sie fungieren zusammen mit der Expression von A2A-Rezeptoren auf Effektor-T-Zellen auch als relevante Inhibitoren der antitumoralen Immunantwort und gelten durch systemische Therapien als beeinflussbar [17,56]. So zeigten sich beispielsweise CD39-defiziente Mäuse nicht in der Lage eine Transplantatabstoßung zu verhindern [17]. Folglich ist eine Analyse dieser Untergruppe der regulatorischen T-Zellen ebenfalls unverzichtbar, um Veränderungen des Adenosin-Signalwegs und dessen Folgen für die Tumorbilogie besser einschätzen zu können.

Die lymphozytäre Homöostase wird zu Gunsten von CD39 exprimierenden regulatorischen T-Zellen durch eine Strahlentherapie und eine kombinierte RCT beeinflusst [54,56]. In der vorliegenden Studie konnte dieser Sachverhalt mittels Vergleich von unmittelbar prätherapeutischen und posttherapeutischen gewonnen Proben derselben Tumorpatienten beschrieben werden. Die bereits erhöhte Frequenz dieser Zelluntergruppe in Patienten mit PKH wird somit, verglichen mit gesunden Spendern, erneut vergrößert. Ob sich die erhöhte Anzahl als überwiegend nachteilhaft erweist, bleibt Gegenstand weiterer Studien. Ein erhöhtes Aufkommen regulatorischer T-Zellen konnte bei Patienten mit

kolorektalen und ovarialen Karzinomen mit prognostisch ungünstigeren Verläufen in Verbindung gesetzt werden [52,68]. Weshalb gerade regulatorische T-Zellen, trotz der hohen Sensitivität CD4 positiver T-Zellen gegenüber einer RCT, eine gewisse Resistenz gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie aufweisen, hat noch nicht abschließend geklärte Hintergründe. Eine Möglichkeit besteht in der vermehrten Bildung von Toll-like Rezeptoren, welche das Tumorwachstum und eine Chemotherapie-Resistenz fördern können [69]. Patienten mit PKH zeigten in diesem Zusammenhang erhöhte Expressionsraten mehrerer Arten von Toll-like Rezeptoren auf regulatorischen T-Zellen [80].

Weiterhin können CD39 exprimierende T-Zellen in eine FoxP3⁺CD25⁺ und eine FoxP3⁻CD25⁻ Subpopulationen untergliedert werden, welche sich wiederum hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenmarker, wie PD-1, sowie der Expressionsrate von CD39 unterscheiden [59]. T-Helfer-Zellen, die nicht über CD39 verfügen, konnten durch eine Stimulation mit IL-2 und TGF- β in CD39 exprimierende T-Zellen umgewandelt werden [59]. Nicht zuletzt deshalb, ist davon auszugehen, dass ein physiologisches Reservoir von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen besteht, welches über eine Zytokinstimulation aktiviert werden kann.

Eine erhöhte Expression von PD-1 auf T-Helferzellen zeigte sich als Folge einer RCT nur auf zirkulierenden T-Helferzellen, aber nicht auf regulatorischen T-Zellen. Demnach könnte das Zusammenspiel eines nachgewiesenen erhöhten Aufkommens von PD-L1 und PD1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Patienten mit PKH einen weiteren Immunzell-inhibierenden Faktor darstellen [36]. Folglich bestärken diese Beobachtungen weitere Studien der Einflussnahme auf den PD-1/PD-L1 Signalweg, insbesondere in Kombination oder im Anschluss an eine systemische Therapie.

Die für Zellmigration verantwortlichen Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bezüglich der Entstehung von Metastasen und stellen potentielle Angriffspunkte einer gezielten antitumoralen Therapie dar. Beispielsweise werden ungewöhnliche hohe Expressionsraten von CCR7 in Lymphknoten im Umfeld des PKH beobachtet [47]. Darüber hinaus zeigte sich CCR7 als fördernd für die Aktivität von Phosphoinositid-3-Kinasen, die für das Überleben und das invasive Wachstum von metastasierenden PKH-Zellen mit verantwortlich gemacht werden [76].

In der ersten Kohorte konnte gezeigt werden, dass CCR7 nach einer RCT auf CD4 positiven Zellen vermindert exprimiert wurde. Besonders interessant ist allerdings die Abnahme der CD8⁺CCR7⁺ Zellfraktion, da diese nicht nur dazu genutzt werden konnte, Blutproben gesunder Spender von Patienten mit PKH zu unterscheiden, sondern auch in direktem Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit für ein Wiederauftreten der Erkrankung steht [16]. Patienten bei denen eine geringe Frequenz dieser T-Zell-Untergruppe festgestellt wurde, wiesen ebenfalls eine geringere Anzahl an Rezidiven auf.

Selbstverständlich können die aufgeführten Resultate nicht bedenkenlos auf das Tumormikromilieu übertragen werden, sie zeigen jedoch potentielle Veränderungen der Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen auf. Eine Herausforderung wird darin bestehen, immunsuppressive Aktivitäten wie die der regulatorischen T- und B-Zellen, im Tumorumfeld zu unterbinden, gleichzeitig jedoch deren wichtige systemische Funktion für das Gleichgewicht des Immunsystems nicht zu gefährden.

Zukünftige Ansätze müssen allerdings nicht auf eine Säule der Immuntherapie, wie der Minderung immunsuppressiver Zellpopulationen, beschränkt bleiben, sondern auch kombinierte Anwendungen erscheinen durchaus sinnvoll. So konnten Resultate einer Tumorstimmulierung am Beispiel des malignen Melanoms verbessert werden, indem B-Zellen entfernt wurden [50]. Von enormer Bedeutung ist außerdem die Berücksichtigung des Entwicklungsgeschehens des PKH. Speziell HPV positive Tumore, die auf Grundlage eines chronisch-inflammatorischen Prozesses entstehen, könnten von einer Immunsuppression profitieren.

Die Blockade des extrazellulären Adenosin-Signalwegs erfolgt entweder durch die Inhibition von CD39, CD73 oder Adenosin-spezifischen Rezeptoren. Während sich die Modulation von CD39 noch in einer vorklinischen Phase befindet, wurde die Blockade von CD73, basierend auf immunstimulierenden Wirkungen *in vitro* und *in vivo* sowie einer beobachteten Verstärkung durch eine zusätzliche Inhibition von PD-1, bei Tumorkranken innerhalb einer klinischen Studie bereits begonnen [29].

Die vorliegende Arbeit zeigt vielseitige Veränderungen des Phänotyps und der Funktion von Lymphozyten durch systemische Behandlungen auf. Die unterschiedlichen Auswirkungen chemotherapeutischer Therapieregime auf das Immunsystem sollten berücksichtigt werden, um eine effektive Kombination mit neuen immunmodulatorischen Behandlungen zu gewährleisten.

Das Forschungsprojekt wurde in Teilen durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant Schu 2536/3) sowie das National Institute of Health (Grants (EKG) DK068575, DK079307, DK091190, HL109002) und die Graduiertenschule der Universität Ulm finanziert.

5. Zusammenfassung

Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region ist in der Lage das Immunsystem zu unterdrücken, wodurch es zu einer frühen Metastasierung sowie lokalen Rezidiven kommen kann. Ein Mechanismus der Immunsuppression ist die Produktion von extrazellulärem Adenosin durch die Ektonukleotidasen CD39 und CD73, welche unter anderem auf regulatorischen Lymphozyten und auf den Tumorzellen zu finden sind.

Trotz umfassender Weiterentwicklungen in der operativen, strahlen- und chemotherapeutischen Behandlung bleibt die Prognose in fortgeschrittenen Stadien ungünstig. Weitreichende Erkenntnisse inwiefern gängige chemotherapeutische Regime die Immunantwort in Tumorpatienten beeinflussen, sind bisher nicht verfügbar. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit den Auswirkungen einer Chemotherapie auf die Adenosin-Produktion durch Lymphozyten.

Blutproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich wurden unmittelbar vor und nach einer Chemotherapie entnommen. Eine zweite Patientenkohorte wurde einige Monate nach abgeschlossener Radiochemotherapie untersucht, um langfristige Auswirkungen zu erfassen. *In vitro* Experimente wurden mit Blutproben gesunder Probanden durchgeführt. Der Phänotyp von Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Funktionalität regulatorischer B-Zellen mittels Lumineszenzverfahrens und Massenspektrometrie quantifiziert. Isolierte B-Zellen wurden gemeinsam mit Cisplatin, Methotrexat, Paclitaxel und 5-Fluorouracil inkubiert und nach einwöchiger Kultur analysiert.

Eine platinbasierte Radiochemotherapie führte in beiden Patientenkohorten zu einer signifikanten Abnahme der Expression von CD39 und CD73 auf B-Zellen, welche mit dem Adenosintriphosphat-Verbrauch und der Bildung seiner Metaboliten Adenosin-5'-monophosphat, Adenosin und Inosin korreliert. Allerdings führte Methotrexat zu einer vermehrten Expression von CD39 und verursachte, im Gegensatz zu den anderen getesteten Zytostatika, keine bedeutsame Hemmung der Proliferation von B-Zellen. Des Weiteren kam es durch

eine Radiochemotherapie zu einer Erniedrigung der absoluten Anzahl und Frequenz von B-Zellen, welche sich kontinuierlich erholte. Daneben fand sich eine Zunahme der Fraktionen IgM und CD5 exprimierender B-Zellen, eine Erhöhung CD4⁺CD39⁺ und CD4⁺PD1⁺ T-Zellen sowie eine Abnahme CD8⁺CCR7⁺ T-Zellen nach einer Radiochemotherapie.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass etablierte Chemotherapien die Funktionalität und den Phänotyp von Lymphozyten in Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich vielfältig beeinflussen können. Während Cisplatin und Paclitaxel die extrazelluläre Adenosin-Produktion und somit die Immunsuppression verringern, wird selbige durch Methotrexat gefördert. Diese Auswirkungen gilt es zukünftig zu berücksichtigen. Das Ziel ist eine effektive Kombination verschiedener Therapieansätze im Rahmen einer individuell zugeschnittenen Behandlung.

6. Literaturverzeichnis

1. Adelstein D J, Li Y, Adams G L, Wagner H Jr, Kish J A, Ensley J F, Schuller D E, Forastiere A A: An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21: 92-98 (2003)
2. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri P G, Fu K K, Cooper J, Vuong T, Forastiere A A, Adams G, Sakr W A, Schuller D E, Ensley J F: Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16: 1310-1317 (1998)
3. Barry C P, Lind S E: Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells. *Cancer research*, 60: 1887-1894 (2000)
4. Beavis P A, Milenkovski N, Henderson M A, John L B, Allard B, Loi S, Kershaw M H, Stagg J, Darcy P K: Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. *Cancer immunology research*, 3: 506-517 (2015)
5. Bernier J, Cooper J S, Pajak T F, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin E M, Jacobs J R, Jassem J, Ang K K, Lefebvre J L: Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head & neck*, 27: 843-850 (2005)
6. Birkeland S A, Storm H H, Lamm L U, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frodin L: Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *International journal of cancer*, 60: 183-189 (1995)
7. Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, Bourredjem A, Baey C, Bourhis J, Pignon J P, MACH-CH Collaborative group: Meta-analysis of chemotherapy in head and

- neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 100: 33-40 (2011)
8. Blot W J, McLaughlin J K, Winn D M, Austin D F, Greenberg R S, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg J B, Stemhagen A, Fraumeni J F, Jr: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research*, 48: 3282-3287 (1988)
9. Boon T, Coulie P G, Van den Eynde B: Tumor antigens recognized by T cells. *Immunology today*, 18: 267-268 (1997)
10. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tورتochaux J, Oudinot P, Bertrand P: Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 2081-2086 (1999)
11. Chandana S R, Conley B A: Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced squamous cancers of the head and neck: current status and future prospects. *Current opinion in oncology*, 21: 218-223 (2009)
12. Chen J F, Eltzschig H K, Fredholm B B: Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nature reviews. Drug discovery*, 12: 265-286 (2013)
13. Clark J R, Frei E, 3rd: Chemotherapy for head and neck cancer: progress and controversy in the management of patients with M0 disease. *Seminars in oncology*, 16: 44-57 (1989)
14. Coussens L M, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867 (2002)
15. Croft M, Benedict C A, Ware C F: Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nature reviews. Drug discovery*, 12: 147-168 (2013)
16. Czystowska M, Gooding W, Szczepanski M J, Lopez-Abaiteiro A, Ferris R L, Johnson J T, Whiteside T L: The immune signature of CD8(+)CCR7(+) T cells in the peripheral circulation associates with disease recurrence in patients with

HNSCC. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19: 889-899 (2013)

17. Deaglio S, Dwyer K M, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J F, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V K, Strom T B, Robson S C: Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204: 1257-1265 (2007)

18. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz J M, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi O R: Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, 97: 587-600 (2001)

19. D'Souza G, Dempsey A: The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive medicine*, 53: 5-11 (2011)

20. Emens L A: Chemoimmunotherapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 16: 295-303 (2010)

21. Emens L A, Middleton G: The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer immunology research*, 3: 436-443 (2015)

22. Ferris R L, Blumenschein G, Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas A D, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes E E, Even C, Worden F, Saba N F, Iglesias Docampo L C, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese W J, Kopit J, Shaw J W, Gillison M L: Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England journal of medicine*, 375: 1856-1867 (2016)

23. Figueiro F, de Oliveira C P, Bergamin L S, Rockenbach L, Mendes F B, Jandrey E H, Moritz C E, Pettenuzzo L F, Sevigny J, Guterres S S, Pohlmann A R, Battastini A M: Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. *Purinergic signalling*, 12: 303-312 (2016)

24. Figueiro F, Muller L, Funk S, Jackson E K, Battastini A M, Whiteside T L: Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology*, 5: e1082703 (2016)
25. Flynn N J, Somasundaram R, Arnold K M, Sims-Mourtada J: The Multifaceted Roles of B Cells in Solid Tumors: Emerging Treatment Opportunities. *Targeted oncology*, 12: 139-152 (2017)
26. Forastiere A A, Goepfert H, Maor M, Pajak T F, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge J A, Chao C, Peters G, Lee D J, Leaf A, Ensley J, Cooper J: Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *The New England journal of medicine*, 349: 2091-2098 (2003)
27. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C: Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012: 473712 (2012)
28. Hatfield S M, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber T H, Belikoff B, Abbott R, Sethumadhavan S, Philbrook P, Ko K, Cannici R, Thayer M, Rodig S, Kutok J L, Jackson E K, Karger B, Podack E R, Ohta A, Sitkovsky M V: Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Science translational medicine*, 7: 277ra30 (2015)
29. Hay C M, Sult E, Huang Q, Mulgrew K, Fuhrmann S R, McGlinchey K A, Hammond S A, Rothstein R, Rios-Doria J, Poon E, Holoweckyj N, Durham N M, Leow C C, Diedrich G, Damschroder M, Herbst R, Hollingsworth R E, Sachsenmeier K F: Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology*, 5: e1208875 (2016)
30. Hoffmann, T K, Schuler, P J: Antigen-specific immunotherapy in head and neck cancer. *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology*, 1: 21758 (2013)
31. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M: Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*, 90: 1600-1610 (1997)

32. Jackson S W, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, Sundberg C, Robson S C: Disordered Purinergic Signaling Inhibits Pathological Angiogenesis in Cd39/Entpd1-Null Mice. *The American Journal of Pathology*, 171: 1395-1404 (2007)
33. Jeremic B, Milicic B, Dagovic A, Vaskovic Z, Tadic L: Radiation therapy with or without concurrent low-dose daily chemotherapy in locally advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22: 3540-3548 (2004)
34. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman S F, Morimoto C: Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science (New York, N.Y.)*, 261: 466-469 (1993)
35. Kasama H, Sakamoto Y, Kasamatsu A, Okamoto A, Koyama T, Minakawa Y, Ogawara K, Yokoe H, Shiiba M, Tanzawa H, Uzawa K: Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC cancer*, 15: 563-015-1577-2 (2015)
36. Lechner A, Schlosser H, Rothschild S I, Thelen M, Reuter S, Zentis P, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Wennhold K, Garcia-Marquez M, Tharun L, Quaas A, Schauss A, Isensee J, Hucho T, Huebbers C, von Bergwelt-Baildon M, Beutner D: Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8: 44418-44433 (2017)
37. Lesterhuis W J, Punt C J, Hato S V, Eleveld-Trancikova D, Jansen B J, Nierkens S, Schreiber G, de Boer A, Van Herpen C M, Kaanders J H, van Krieken J H, Adema G J, Figdor C G, de Vries I J: Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, 121: 3100-3108 (2011)
38. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen H V, Laenkholm A V, Tarin D, Jensen O N, Ditzel H J: Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer

- cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 8: 1436-1449 (2009)
39. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth T F, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R, Lunov O, Nienhaus G U, Simmet T, Kreienberg R, Moller P, Schrezenmeier H, Jahrsdorfer B: Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer research*, 73: 2468-2479 (2013)
40. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis P A, Darcy P K, Smyth M J, Stagg J: CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 11091-11096 (2013)
41. Majumdar S, Aggarwal B B: Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167: 2911-2920 (2001)
42. Malaviya A N: Methotrexate intolerance in the treatment of rheumatoid arthritis (RA): effect of adding caffeine to the management regimen. *Clinical rheumatology*, 36: 279-285 (2017)
43. Michaud M, Martins I, Sukkurwala A Q, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, di Virgilio F, Zitvogel L, Kroemer G: Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 334: 1573-1577 (2011)
44. Mittal D, Young A, Stannard K, Yong M, Teng M W, Allard B, Stagg J, Smyth M J: Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer research*, 74: 3652-3658 (2014)
45. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson S C, Sevigny J, Matsue H, Enjoji K, Takashima A: CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase:

modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nature medicine*, 8: 358-365 (2002)

46. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson C C: Regulatory T cells in cancer. *Advances in Cancer Research*, 107: 57-117 (2010)

47. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber P A, Kubitza R, Schirlau K, Frankenkunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz L O, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside T L, Homey B, Hoffmann T K: Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *International journal of cancer*, 118: 2147-2157 (2006)

48. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P: Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, 182: 4499-4506 (2009)

49. Pardoll D M: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12: 252-264 (2012)

50. Perricone M A, Smith K A, Claussen K A, Plog M S, Hempel D M, Roberts B L, St George J A, Kaplan J M: Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 27: 273-281 (2004)

51. Pretscher D, Distel L V, Grabenbauer G G, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G: Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC cancer*, 9: 292-2407-9-292 (2009)

52. Sato E, Olson S H, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth A A, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y T, Ohtani H, Old L J, Odunsi K: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18538-18543 (2005)

53. Saze Z, Schuler P J, Hong C S, Cheng D, Jackson E K, Whiteside T L: Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 122: 9-18 (2013)
54. Schaeue D, Xie M W, Ratican J A, McBride W H: Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Frontiers in oncology*, 2: 90 (2012)
55. Schrier S M, van Tilburg E W, van der Meulen H, Ijzerman A P, Mulder G J, Nagelkerke J F: Extracellular adenosine-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake. *Biochemical pharmacology*, 61: 417-425 (2001)
56. Schuler P J, Harasymczuk M, Schilling B, Saze Z, Strauss L, Lang S, Johnson J T, Whiteside T L: Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19: 6585-6596 (2013)
57. Schuler P J, Hoffmann T K, Gauler T C, Bergmann C, Brandau S, Lang S: Immunotherapy of head and neck cancer. Current developments. *HNO*, 61: 559-572 (2013)
58. Schuler P J, Laban S, Doescher J, Bullinger L, Hoffmann T K: Novel Treatment Options in Head and Neck Cancer. *Oncology research and treatment*, 40: 342-346 (2017)
59. Schuler P J, Schilling B, Harasymczuk M, Hoffmann T K, Johnson J, Lang S, Whiteside T L: Phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ and CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} T-cell subsets in cancer patients. *European journal of immunology*, 42: 1876-1885 (2012)
60. Schuler P J, Westerkamp A M, Kansy B A, Bruderek K, Dissmann P A, Dumitru C A, Lang S, Jackson E K, Brandau S: Adenosine metabolism of human mesenchymal stromal cells isolated from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Immunobiology*, 222: 66-74 (2017)

61. Seiwert T Y, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder J P, Heath K, McClanahan T, Lunceford J, Gause C, Cheng J D, Chow L Q: Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet. Oncology*, 17: 956-965 (2016)
62. Serra S, Horenstein A L, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson S C, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S: CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*, 118: 6141-6152 (2011)
63. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor R A, Stervbo U, Hilgenberg E, Ries S, Dang V D, Jaimes Y, Daridon C, Li R, Juneau L, Boudinot P, Wilantri S, Sakwa I, Miyazaki Y, Leech M D, McPherson R C, Wirtz S, Neurath M, Hoehlig K, Meinel E, Grutzkau A, Grun J R, Horn K, Kuhl A A, Dorner T, Bar-Or A, Kaufmann S H E, Anderton S M, Fillatreau S: IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 507: 366-370 (2014)
64. Spychala J: Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & therapeutics*, 87: 161-173 (2000)
65. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng M W, Darcy P K, Smyth M J: CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer research*, 71: 2892-2900 (2011)
66. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer K M, Smyth M J: Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 1547-1552 (2010)
67. Stevanovic S, Draper L M, Langan M M, Campbell T E, Kwong M L, Wunderlich J R, Dudley M E, Yang J C, Sherry R M, Kammula U S, Restifo N P, Rosenberg S A, Hinrichs C S: Complete regression of metastatic cervical cancer

- after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33: 1543-1550 (2015)
68. Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M: Intratumoral FOXP3+VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 146: 26-33 (2013)
69. Szajnik M, Szczepanski M J, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Whiteside T L: TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 28: 4353-4363 (2009)
70. Talme T, Bergdahl E, Sundqvist K G: Methotrexate and its therapeutic antagonists caffeine and theophylline, target a motogenic T-cell mechanism driven by thrombospondin-1 (TSP-1). *European journal of immunology*, 46: 1279-1290 (2016)
71. Thibult M L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, Chetaille B, Olive D: PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International immunology*, 25: 129-137 (2013)
72. Timar J, Forster-Horvath C, Lukits J, Dome B, Ladanyi A, Remenar E, Kasler M, Bencsik M, Repassy G, Szabo G, Velich N, Suba Z, Elo J, Balatoni Z, Bajtai A, Chretien P, Talor E: The effect of leukocyte interleukin injection (Multikine) treatment on the peritumoral and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and on tumor epithelia: a possible new approach to augmenting sensitivity to radiation therapy and chemotherapy in oral cancer--a multicenter phase I/II clinical Trial. *The Laryngoscope*, 113: 2206-2217 (2003)
73. Tsuchiya A, Nishizaki T: Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways. *World journal of gastroenterology*, 21: 10931-10935 (2015)

74. Tsujimoto S, Yanagimachi M, Tanoshima R, Urayama K Y, Tanaka F, Aida N, Goto H, Ito S: Influence of ADORA2A gene polymorphism on leukoencephalopathy risk in MTX-treated pediatric patients affected by hematological malignancies. *Pediatric blood & cancer*, 63: 1983-1989 (2016)
75. Vermorken J B, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart J S, Jelic S, Betka J, Preiss J H, van den Weyngaert D, Awada A, Cupissol D, Kienzer H R, Rey A, Desauvais I, Bernier J, Lefebvre J L, EORTC 24971/TAX 323 Study Group: Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *The New England journal of medicine*, 357: 1695-1704 (2007)
76. Wang J, Zhang X, Thomas S M, Grandis J R, Wells A, Chen Z G, Ferris R L: Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene*, 24: 5897-5904 (2005)
77. Weaver A, Flemming S, Kish J, Vandenberg H, Jacob J, Crissman J, Al-Sarraf M: Cis-platinum and 5-fluorouracil as induction therapy for advanced head and neck cancer. *American Journal of Surgery*, 144: 445-448 (1982)
78. Whiteside T L: Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral oncology*, 45: e119-23 (2009)
79. Whiteside T L, Mandapathil M, Schuler P: The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Current medicinal chemistry*, 18: 5217-5223 (2011)
80. Wild C A, Brandau S, Lindemann M, Lotfi R, Hoffmann T K, Lang S, Bergmann C: Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 136: 1253-1259 (2010)
81. Wolchok J D, Kluger H, Callahan M K, Postow M A, Rizvi N A, Lesokhin A M, Segal N H, Ariyan C E, Gordon R A, Reed K, Burke M M, Caldwell A, Kronenberg S A, Agunwamba B U, Zhang X, Lowy I, Inzunza H D, Feely W, Horak C E, Hong

- Q, Korman A J, Wigginton J M, Gupta A, Sznol M: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine*, 369: 122-133 (2013)
82. Yegutkin G G, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila J P, Elima K, Jalkanen S, Salmi M: Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *European journal of immunology*, 41: 1231-1241 (2011)
83. Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune Y, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Hirose A, Ogi H, Hiraki A, Jono H, Hamada A, Yoshida K, Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M: Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21: 312-321 (2015)
84. Zhang C, Xin H, Zhang W, Yazaki P J, Zhang Z, Le K, Li W, Lee H, Kwak L, Forman S, Jove R, Yu H: CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. *Immunity*, 44: 913-923 (2016)
85. Zhou X, Su Y X, Lao X M, Liang Y J, Liao G Q: CD19(+)IL-10(+) regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Oral oncology*, 53: 27-35 (2016)
86. Ziebart A, Huber U, Jeske S, Laban S, Doescher J, Hoffmann T K, Brunner C, Jackson E K, Schuler P J: The influence of chemotherapy on adenosine-producing B cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23533> (20.12.2017)
87. Zou W: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 6: 295-307 (2006)

Veröffentlichungen: Die im Methoden- und Ergebnisteil veröffentlichten Tabellen und Schaubilder sind zum Teil genehmigte Inhalte oder Übersetzungen der Abbildungen oder Tabellen folgender Publikation:

The influence of chemotherapy on adenosine-producing B cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma.

Ziebart A, Huber U, Jeske S, Laban S, Doescher J, Hoffmann T K, Brunner C, Jackson E K, Schuler P J.

Oncotarget (2017)

10.18632/oncotarget.23533

CC BY 3.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Patrick Schuler. Er gab mir die einzigartige Möglichkeit zu promovieren und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Seine außergewöhnliche Begeisterung für die Forschung und die beständige Unterstützung in meiner gesamten Ausbildung nehme ich mir stets zum Vorbild. Weiterhin danke ich herzlich Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann, dem Leiter der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, für seine hervorragende Unterstützung und Ausbildung sowohl in wissenschaftlicher als auch klinischer Hinsicht.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Laborteam, darunter Silke Schwarz, Alexander Elsässer, Monika Jerg, Gabriela Cudek und Sandra Jeske, für die stetige Hilfsbereitschaft, konstruktive Problembehandlungen und Diskussionen. Herrn Professor Edwin Jackson aus dem pharmakologischen Institut der Universität von Pittsburgh danke ich für eine sehr effiziente und spannende Zusammenarbeit trotz großer Entfernung. Mit meinem Ko-Doktoranden Ulrich Huber durchlief ich zusammen die ersten Schritte in der Forschungswelt und ich konnte mich immer auf ihn verlassen. Besten Dank.

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich den Patienten und anderen Probanden, die durch ihre Blutspende diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Danke an meine wunderbare Familie, für das Verständnis und die Begeisterung an all meinen Entscheidungen und Handlungen.

Lebenslauf

Andreas Ziebart

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

(Seite 1)

Lebenslauf

Andreas Ziebart

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

(Seite 2)