

**Epigenetische Regulation und klinische Relevanz der  
Immuncheckpoints PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA  
in Kopf-Hals- und Blasenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Lennert Herbert Wüst**

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Dimo Dietrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Bald

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.08.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Kopf- und Halstumoren.....	9
1.2 Ätiologie von HNSCC .....	10
1.3 Behandlung von HNSCC .....	10
1.4 Epidemiologie und Ätiologie vom Urothelkarzinom .....	11
1.5 Behandlung vom UC.....	11
1.6 Biomarker .....	12
1.7 DNA-Methylierung .....	13
1.8 Funktion und klinische Anwendung von 5-Aza-2'-deoxycytidine.....	13
1.9 Immunologische und therapeutische Bedeutung von Immuncheckpoints in HNSCC und UC.....	14
1.9.1 Funktion von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC.....	14
1.9.2 Regulation von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC .....	16
1.9.3 Prognostische und prädiktive Relevanz von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC.....	16
1.10 Ziele .....	18
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1 Equipment zur Durchführung der Experimente .....	19
2.1.1 Komponenten für die Hauptexperimente .....	19
2.1.2 Geräte zur Durchführung der Experimente.....	20
2.1.3 Verwendete Zellkulturmedien .....	22
2.2 Zellkulturexperimente .....	23
2.2.1 Behandlung von HNSCC-Zelllinien.....	23
2.2.2 Behandlung von UC-Zelllinien .....	23
2.3 Durchführung der Durchflusszytometrie .....	24
2.4 Durchführung der Immunhistochemie.....	25
2.4.1 Immunhistochemie von BTLA und CTLA-4.....	25
2.4.2 Immunhistochemie von PD-L1.....	26
2.5 Durchführung Gelelektrophorese.....	26

2.6 RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA .....	27
2.6.1 RNA-Isolation aus generierten Zellpellets .....	27
2.6.2 Umschreibung von RNA in cDNA .....	27
2.7 Durchführung der qRT-PCR .....	28
2.7.1 Primertest für die qRT-PCR .....	28
2.7.2 Detektion der individuellen mRNA-Expressionsprofile .....	29
2.8 Bisulfitierung und Durchführung einer quantitativen methylierungsspezifischen PCR .....	31
2.8.1 Bisulfitierung und Aufreinigung der gewonnenen DNA.....	31
2.8.2 Auswahl der analysierten CpG-Stellen .....	31
2.8.3 qMSP von <i>LAG3</i> .....	32
2.8.4 qMSP von <i>CTLA4</i> .....	33
2.9 Patientenkollektive .....	35
2.9.1 Patienten UKB ICB / Nicht-ICB Patientenkollektiv .....	35
2.9.2 Kollektiv der mUC-Patienten.....	37
2.10 Statistik .....	40
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1 Die Signifikanz von PD-L1 im mUC .....	41
3.1.1 PD-L1-Promotor-Hypomethylierung als prädiktiver Biomarker für das immuntherapeutische Ansprechen und Überleben bei mUC.....	41
3.1.2 Pharmakologische Demethylierung von UC-Zelllinien.....	42
3.2 Analyse der DNA-Methylierung der Gene <i>CTLA4</i> und <i>LAG3</i> in der mUC-Kohorte ..	44
3.3 BTLA-Expression in UC-Zelllinien .....	44
3.4 Bedeutung von CTLA-4 in HNSCC.....	46
3.4.1 Klinische Relevanz der <i>CTLA4</i> -Promotormethylierung in HNSCC.....	46
3.4.2 Einfluss von Decitabin auf die Expression von CTLA-4.....	47
3.5 Analyse der DNA-Methylierung der Gene <i>PD-L1</i> , <i>LAG3</i> und <i>BTLA</i> bei HNSCC-Patienten.....	50
3.6 Einfluss von Decitabin auf die Expression von LAG-3.....	51
3.7 PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien.....	52
3.8 BTLA-Expression in HNSCC-Zelllinien.....	53
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>54</b>

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>9. Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>78</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin beta
ALAS1	5'-Aminolevulinate Synthase 1
AT	Austria
BP	Base pairs
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CI	Confidence Interval
CN	China
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CPS	Combined positivity score
CR	Complete response
C <sub>T</sub>	Cycle threshold
CT	Computed tomography
ctDNA	Circulating tumor DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
dH <sub>2</sub> O	Distilled water
ddH <sub>2</sub> O	Double-distilled water
DE	Germany
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DK	Denmark
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EB	Ethidium bromide
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence activated cell sorting

FKS	Fetal calf serum
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTC	Guanidine thiocyanate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonic acid
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Human papillomavirus
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1
HR	Hazard Ratio
ICB	Immune checkpoint blockade
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IHC	Immunohistochemistry
IQR	Interquartile range
JP	Japan
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
lncRNA	Long non-coding Ribonucleic acid
MALAT1	Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MFI	Mean fluorescence intensity
mUC	Metastatic urothelial carcinoma
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NTP	Nucleoside triphosphate
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Progressive disease
PD-1	Programmed cell death protein-1

PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PFS	Progression-free survival
PR	Partial response
QMS	Quantitative methylation score
qMSP	Quantitative methylation-specific PCR
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
RNA	Ribonucleic acid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SDHA	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
SD	Stable disease
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TAE	TRIS-Acetate-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TPS	Tumor proportion score
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UC	Urothelial carcinoma
UICC	Union for International Cancer Control
UKB	University Hospital Bonn
UK	United Kingdom
US	United States of America

## 1. Einleitung

### 1.1 Kopf- und Halstumoren

Karzinome des Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx, Larynx, der Speicheldrüsen und der Mundhöhle werden den Kopf- und Halstumoren zugeordnet. In über 90 % der Fälle gehen diese Tumore aus der dort ortsständigen Schleimhaut, dem Plattenepithel, hervor (englisch "head and neck squamous cell carcinoma", HNSCC) (Vigneswaran und Williams, 2014). Tumoren der Nase und Nasennebenhöhle sowie der Speicheldrüsen werden in der Entität der Kopf- und Halstumore aufgrund ihrer unterschiedlichen Gewebeart, Therapie und Entstehungsgeschichte meist gesondert behandelt und sind daher nicht Gegenstand dieser Dissertation (Thompson und Bishop, 2022). Die Prognose von Patienten mit HNSCC ist mit einer mittleren 5-Jahresüberlebensrate von ~ 65,0 %, trotz Operation, Bestrahlung und Chemotherapie als prognostisch ungünstig einzuordnen (Pulte und Brenner, 2010). Jedes Jahr gibt es weltweit knapp 900.000 neue Fälle dieser Erkrankung (Ferlay et al., 2021) (**Tab. 1**).

**Tab. 1 Weltweite Anzahl und Mortalität von HNSCC pro Jahr (Ferlay et al., 2021).**

Lokalisation Tumor	Anzahl der neuen Fälle pro Jahr	Anzahl der Todesfälle pro Jahr
Nasopharynx	133.400	72.987
Larynx	184.600	77.194
Oropharynx	98.400	51.005
Hypopharynx	84.300	34.984
Speicheldrüsen	53.600	22.176
Mundhöhle	377.700	177.384

## 1.2 Ätiologie von HNSCC

Die langjährige Exposition gegenüber Nikotin sowie Alkoholabusus korreliert mit der Entstehung von HNSCC (Blot et al., 1988; Lewin et al., 1998; Maasland et al., 2014). Das Humane Papillomavirus (englisch „human papillomavirus“ HPV), besonders die Hochrisikovariante HPV-16, hat sich in den letzten Jahren als Ursache, speziell für Karzinomen des Oropharynx, manifestiert (Schache et al., 2016; Lechner et al., 2022). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil an HPV-assoziierten HNSCC weltweit und in Deutschland zugenommen hat (Gillison et al., 2015; Reuschenbach et al., 2019). Hervorzuheben ist die günstigere Prognose von HPV-assoziierten HNSCC (Ang et al., 2010; Gillison und Restighini, 2015). Karzinome im Nasopharynx sind mit dem Auftreten vom Epstein-Barr-Virus assoziiert (Mirzamani et al., 2006).

## 1.3 Behandlung von HNSCC

Die Behandlung der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich umfasst vier zentrale Behandlungsmethoden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021):

- Chirurgische Resektion
- Radiatio oder Radiatio kombiniert mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie (Radiochemotherapie)
- Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab meist in Kombination mit einer Chemotherapie
- Immuntherapie

Die chirurgische Resektion wurde durch den Einsatz der transoralen Robotertechnologie in den letzten Jahren verbessert und ermöglicht in manchen Fällen eine Resektion *in sano* oder reseziert den Tumor soweit, dass eine adjuvante Radiochemotherapie angewendet werden kann (Meccariello et al., 2022). Trotz der initialen Resektion kommt es häufig zum Rezidiv, welches eine erneute Operation, Bestrahlung oder letztendlich eine palliative Behandlung erforderlich macht (Ionna et al., 2021). Zusätzlich wird Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC, insbesondere wenn die Tumor- und

Immunzellen PD-L1 (englisch „programmed cell death ligand-1“, PD-L1) exprimieren, die Behandlung mit Pembrolizumab, einem Inhibitor gegen das programmierte Zelltod-Protein 1 (englisch „programmed cell death protein-1“, PD-1), als Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-Fluorouracil empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

#### **1.4 Epidemiologie und Ätiologie vom Urothelkarzinom**

Das Urothelkarzinom (englisch „urothelial carcinoma“, UC) ist eine häufig diagnostizierte Krebsart (Ferlay et al., 2021). Die weltweite Inzidenz beträgt bei Männern 9,5 und bei Frauen 2,4 Fälle pro 100.000 Personen (Ferlay et al., 2021). Aufgrund unterschiedlicher Risikofaktoren, Diagnostik und therapeutischer Verfügbarkeit variiert die Inzidenz und Mortalität jedoch stark zwischen den einzelnen Ländern (Zhang et al., 2023). Langjährige Exposition gegenüber Nikotin verursacht bei Männern 50 bis 65 % und bei Frauen 20 bis 30 % der UC (Freedman et al., 2011). Neben dem Nikotinabusus ist die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen ein weiterer Risikofaktor (Gawrych et al., 2013)

#### **1.5 Behandlung vom UC**

Die Behandlung des UC erfolgt durch die Resektion des Tumors und adjuvante intravesikale Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Bei dem metastasierten Urothelkarzinom (englisch „metastatic urothelial carcinoma“, mUC) haben sich die Therapie und der Behandlungserfolg in den letzten Jahren verändert (Tonni et al., 2024). Die auf Cisplatin basierende Chemotherapie ist eine Behandlungsmöglichkeit des mUC (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Eine Alternative zur Chemotherapie stellen Immuncheckpoint Inhibitoren der PD-1 / PD-L1-Achse dar. Diese Therapie wird Patienten mit mUC empfohlen, die nach einer platinhaltigen Chemotherapie einen Progress zeigen, oder cisplatin-ungeeigneten Patienten mit positivem PD-L1-Status (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Enfortumab-Vedotin hat sich als

wirksame Therapieoption für Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder mUC etabliert (Yu et al., 2021). Besonders vielversprechend ist der Einsatz bei cisplatin-ineligible Patienten, die zuvor mit einem PD-1 / PD-L1-Inhibitor behandelt wurden (Yu et al., 2021). In der Phase-II-Studie EV-201 zeigte Enfortumab Vedotin eine bestätigte objektive Ansprechrate von 52 %, einschließlich einer kompletten Remissionsrate (englisch „complete remission“, CR) von 20 % (Yu et al., 2021).

## **1.6 Biomarker**

Ein Biomarker ist ein Indikator für biologische Prozesse, Krankheitsprozesse oder Reaktionen auf therapeutische Maßnahmen, der objektiv gemessen und bewertet werden kann (Biomarkers Definitions Working Group., 2001). Biomarker werden in diagnostische, prädiktive, prognostische sowie Prädispositionsbiomarker unterteilt und unterstützen sowohl die Therapieauswahl als auch die Risikoabschätzung und Überwachung von Krankheitsverläufen (Carlomagno et al., 2017). Besonders Nukleinsäuren eignen sich als effektive molekulare Biomarker für Tumorerkrankungen aufgrund ihrer Fähigkeit genetische und epigenetische Veränderungen zu erfassen (Schwarzenbach et al., 2011; Dietrich et al., 2014). Moderne Technologien ermöglichen die genaue Quantifizierung dieser Biomarker aus verschiedenen Probenmaterialien, wie beispielsweise Blutproben, Urin, Speichel und Tumorbiopsien (Bao et al., 2024; Dietrich et al., 2014). Diese molekularen Biomarker bieten nicht nur Einblicke in den Krankheitsverlauf, sondern ermöglichen auch ein individuelles therapeutisches Management.

Der PD-L1-Status wird in der Immunonkologie als ein bedeutsamer prädiktiver Biomarker betrachtet, der jedoch durch verschiedene Herausforderungen in seiner Robustheit beeinträchtigt ist. Laut der Habilitationsschrift von Klümper (2024) liegt eine dieser Herausforderungen in der Vielfalt der verwendeten Antikörperklone und Expressionsniveaus. Dabei kann die Verwendung unterschiedlicher Antikörperklone und Expressionsniveaus wie dem prozentualen Anteil der PD-L1-Expression auf Tumorzellen (englisch „tumor proportion score“, TPS), Immunzellen oder dem kombinierten

Positivitätswert (englisch „combined positivity score“, CPS) zu inkonsistenten Ergebnissen führen und die Interpretation erschweren (Klümper, 2024). Laut Studien beeinträchtigt die hohe Variabilität zwischen Laboren und Beobachtern signifikant die Zuverlässigkeit des PD-L1-Status als Biomarker (Eckstein et al., 2019; Eckstein und Gupta, 2019; Gibney et al., 2016; Sommer et al., 2020). Diese Ergebnisse variieren erheblich und unterstreichen die Notwendigkeit Standardisierungsmaßnahmen zu implementieren, um die Verlässlichkeit von PD-L1 als prädiktiven Biomarker zu verbessern.

### **1.7 DNA-Methylierung**

Die DNA-Methylierung, insbesondere an Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (englisch „cytosine-phosphate-Guanine“, CpG), ist besonders relevant für die Transkriptionsregulation (Momparler und Bovenzi, 2000). DNA-Methyltransferasen sind in der Lage die Base Cytosin in CpG-Dinukleotiden des Genoms mit einer Methylgruppe zu versehen, wodurch die Transkription des Gens herunterreguliert wird (Momparler und Bovenzi, 2000). In einigen Tumorzellen, in denen Teile der Desoxyribonukleinsäure (englisch „deoxyribonucleic acid“, DNA) hypo- oder hypermethyliert sind, entsteht eine Fehlregulierung einzelner Gene und eine Entartung der Zellen (Momparler und Bovenzi, 2000). Im Vergleich zur mRNA- oder Proteinexpression zeigt die DNA-Methylierung in der Regel weniger dynamische Schwankungen, da sie häufig als stabiler epigenetischer Mechanismus fungiert (Luo et al., 2018). Die DNA-Methylierung nimmt keinen Einfluss auf die Basenpaarung und ist chemisch stabil.

### **1.8 Funktion und klinische Anwendung von 5-Aza-2'-deoxycytidine**

Das Cytidinanalogon 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabin) dient, sofern es in die DNA eingebaut wird, als ein potenter Inhibitor der DNA-Methylierung (Brown und Plumb, 2004). Decitabin inaktiviert die DNA-Methyltransferase-1 und führt zur Demethylierung des Genoms (Brown und Plumb, 2004). Dadurch werden Tumorsuppressorgene reaktiviert,

die durch Promotormethylierung unterdrückt wurden, und induzieren den Zelltod (Brown und Plumb, 2004; Esteller, 2008). Dementsprechend haben sich Decitabin sowie das Ribonukleosid-Analogon 5-Azacytidine in den letzten Jahren als wichtige Behandlungsansätze der akuten myeloischen Leukämie und des myelodysplastischen Syndroms etabliert (Bryan et al., 2011; Claus et al., 2005; Momparler, 2012).

## **1.9 Immunologische und therapeutische Bedeutung von Immuncheckpoints in HNSCC und UC**

### **1.9.1 Funktion von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC**

Die vorliegende Arbeit zielt auf die Untersuchung der Bedeutung der Immuncheckpoints PD-L1, des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Protein 4 (englisch „cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4“, CTLA-4), Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (englisch „lymphocyte-activation gene 3“, LAG-3) und dem B- und T-Lymphozyten-Attenuator (englisch „B- and T-lymphocyte attenuator“, BTLA) in HNSCC und UC ab. Diese Moleküle sind entscheidend für die Kontrolle der T-Zell-Aktivität und ermöglichen Tumorzellen der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen.

PD-L1 bindet an den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen, einschließlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Lei et al., 2020). Diese Interaktion führt zur Hemmung der T-Zell-Funktion, was sich in einer verringerten Interferon- $\gamma$ -Produktion (englisch „interferon  $\gamma$ “, IFN- $\gamma$ ) und reduzierten zytotoxischen Aktivität äußert (Arasanz et al., 2017; Lei et al., 2020). IFN- $\gamma$  bindet an den IFN- $\gamma$ -Rezeptor auf der Oberfläche von Tumorzellen, die PD-L1 exprimieren (Lei et al., 2020). Die Bindung des Liganden PD-L1 an seinen Rezeptor, PD-1, führt zur Unterdrückung der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**Abb. 1**)(Lei et al., 2020). Die Proteine PD-L1 und PD-1 werden durch die Gene *CD274* bzw. *PDCD1* kodiert, welche im Folgenden vereinfacht *PD-L1* bzw. *PD-1* genannt werden.

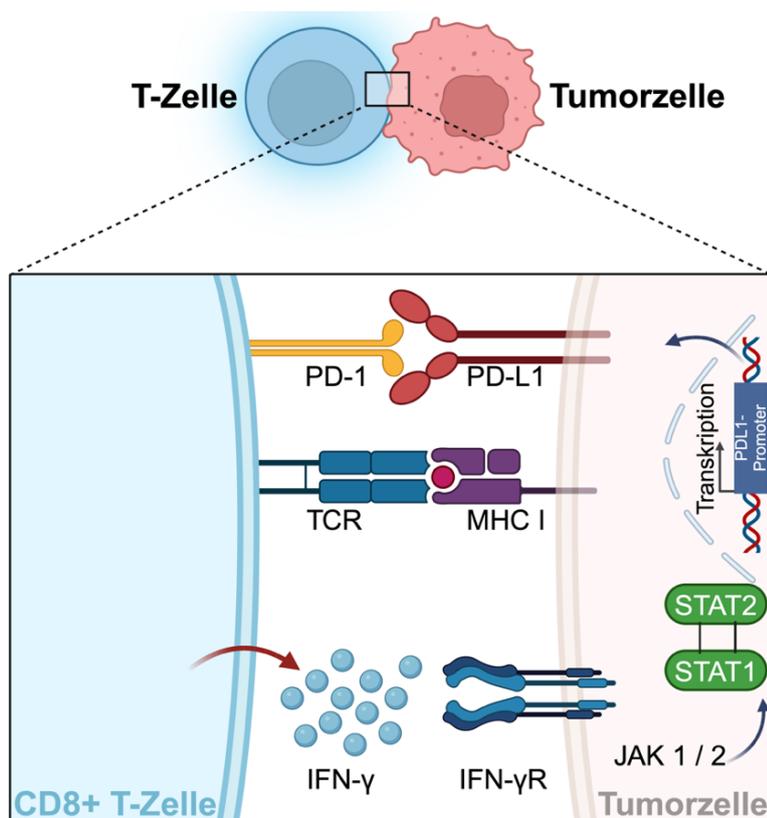
CTLA-4 wird auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert und fungiert als negativer Regulator der T-Zell-Immunkfunktion (Alegre et al., 2001). CTLA-4 wird durch

das Gen *CTLA4* kodiert.

LAG-3 wird hauptsächlich von T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (Triebel et al., 1990). LAG-3 bindet an den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II und fungiert als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung, insbesondere bei erschöpften T-Zellen (Baixeras et al., 1992; Chocarro et al., 2021; Triebel et al., 1990). Das LAG-3-Protein wird durch das *LAG3*-Gen kodiert.

BTLA ist ein weiterer Immuncheckpoint, der neben CTLA-4, PD-1 und dem Induzierbarer T-Zell-Kostimulator (englisch „inducible T-cell costimulator“, ICOS) zur CD28-Immunglobulin-Superfamilie gehört (Ceeraz et al., 2013). BTLA fungiert als inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen und wird auf naiven T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen sowie Makrophagen exprimiert (Watanabe et al., 2003; Steinberg et al., 2011).

Das BTLA-Protein wird durch das gleichnamige Gen *BTLA* kodiert.



**Abb. 1 Wirkungsmechanismus von der PD-L1 / PD-1-Immuncheckpoint-Achse.** Abbildung erzeugt mit biorender.com. Abbildung entspricht in abgeänderter Form (Lei et al., 2020).

### **1.9.2 Regulation von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC**

Immuncheckpoints wie PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort gegenüber Tumoren wie HNSCC und UC (Alegre et al., 2001; Baixeras et al., 1992; Lee et al., 2021; Rizzo et al., 2022; Triebel et al., 1990). Diese Immuncheckpoints haben unterschiedliche Mechanismen, um die Immunantwort zu modulieren und können daher potenzielle Ziele für Immuntherapien sein. CTLA-4 hemmt die T-Zell-Aktivierung, indem es mit dem CD28-Rezeptor um die Bindung an B7-Moleküle konkurriert (Alegre et al., 2001; Mei et al., 2020). Dies führt zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen und trägt zur Immunsuppression bei, was insbesondere in der Tumormikroumgebung von HNSCC und UC eine entscheidende Rolle spielt (Mei et al., 2020; Ogbuji et al., 2023). PD-L1 unterdrückt die Immunaktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Bindung an den PD-1-Rezeptor und führt dadurch zu einer Erschöpfung der T-Zellen sowie einer Schwächung der Immunantwort (Lei et al., 2020). Darüber hinaus wirken sowohl LAG-3 als auch BTLA als negative Regulatoren der T-Zellaktivierung (Baixeras et al., 1992; Triebel et al., 1990; Ceeraz et al., 2013; Lee et al., 2021). Durch ihre Interaktionen mit anderen Molekülen auf der Oberfläche von T-Zellen modulieren sie die T-Zellantwort und beeinflussen die Immunreaktion gegenüber dem Tumor. Die gezielte Modulation dieser Immuncheckpoints bietet vielversprechende Ansätze für die Entwicklung von Tumorthérapien, die das Immunsystem mobilisieren und die Immunantwort verstärken können.

### **1.9.3 Prognostische und prädiktive Relevanz von PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in HNSCC und UC**

Die prognostische und prädiktive Relevanz von Immuncheckpoints wie PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA ist für das klinische Management von HNSCC und UC von hoher Bedeutung (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023; Li et al., 2023; Vogt et al., 2022). Diese Zielstrukturen eignen sich besonders als Biomarker, da sie selbst Ziele für immunmodulierende Therapien darstellen, die die Behandlungsmöglichkeiten erweitern

sollen. Klinische Studien belegen, dass die Kombination von CTLA-4- und PD-1-Inhibitoren das Gesamtüberleben (englisch „overall survival“, OS) bei Patienten mit metastasiertem Melanom und Nierenzellkarzinom signifikant verbessert (Hodi et al., 2016; Motzer et al., 2020). PD-L1 ist ein weiterer wichtiger prädiktiver Biomarker für die Ansprechrate auf ICB (Klümper et al., 2023). Die Metaanalyse von Rizzo et al. (2022) deutet darauf hin, dass PD-L1-positive mUC eine bessere Reaktion auf ICB zeigen könnten als PD-L1-negative mUC. Die Expression von PD-L1 wird epigenetisch durch DNA-Promotormethylierung reguliert (Gevensleben et al., 2016; Goltz et al., 2017a; Goltz et al., 2017b; Franzen et al., 2018; Micevic et al., 2019; Ralser et al., 2021; Newell et al., 2022). Für LAG-3 und BTLA liefern Studien, wie die von Li et al. (2023) und Andrzejczak und Karabon (2024), Hinweise auf eine Verbindung zwischen ihrer Expression und einem ungünstigen Krankheitsverlauf, wobei dies für LAG-3 beim UC und für BTLA in verschiedenen Tumorarten gezeigt wurde. Dennoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um die genaue prognostische Bedeutung ihrer erhöhten Expression umfassend zu klären. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von *LAG3* das OS im Nierenzellkarzinom (Klümper et al., 2020) und im Aderhautmelanom (de Vos et al., 2022) sowie das progressionsfreie Überleben (englisch: „progression-free survival“, PFS) im Melanom vorhersagen kann (Fröhlich et al., 2020).

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer genaueren Charakterisierung der prognostischen und prädiktiven Bedeutung dieser Immuncheckpoints bei HNSCC und UC, um personalisierte Therapieansätze zu entwickeln und die klinische Versorgung dieser Patientengruppen zu verbessern.

### **1.10 Ziele**

Die Ziele dieser Dissertation sind auf die Untersuchung der epigenetischen Regulation und der klinischen Relevanz von Immuncheckpoints in HNSCC und mUC ausgerichtet. Dabei werden sowohl molekulare Mechanismen, als auch deren Bedeutung für das Therapieansprechen und die Prognose der Patienten analysiert. Ein zentraler Fokus liegt auf der Untersuchung des Einflusses der DNA-Methylierung auf die Expression der Immuncheckpoints PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA. Hierbei wird insbesondere analysiert, wie eine pharmakologische Demethylierung durch Decitabin die Gen- und Oberflächenexpression dieser Immuncheckpoints in HNSCC- und UC-Zelllinien beeinflusst. Ergänzend wird der Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus dieser Immuncheckpoints und klinischen Parametern wie dem PFS und OS von Patienten untersucht. Ziel ist es, prädiktive Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren vorhersagen können.

Darüber hinaus wird die klinische Relevanz dieser epigenetischen Veränderungen in retrospektiven Patientenkohorten validiert. Dabei wird geprüft, ob Methylierungsmuster mit dem Therapieansprechen oder der Prognose korrelieren.

Zur Zielerreichung werden verschiedene methodische Ansätze eingesetzt, darunter Durchflusszytometrie (englisch „fluorescence activated cell sorting“, FACS) zur Messung der Oberflächenexpression, Immunhistochemie (englisch „immunohistochemistry“, IHC) zur optischen Beurteilung von Tumorzellen sowie der quantitativen Reverse-Transkriptions-PCR (englisch „quantitative reverse transcription PCR“, qRT-PCR) und quantitativer methylierungsspezifischer PCR (englisch „quantitative methylation-specific PCR“, qMSP) zur Analyse von Genexpression und Methylierungsmustern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Equipment zur Durchführung der Experimente

#### 2.1.1 Komponenten für die Hauptexperimente

Die folgenden zwei Tabellen listen die verwendeten Komponenten und Geräte sowie die zugehörigen Unternehmen auf.

#### Tab. 2 Komponenten für die Hauptexperimente.

Dargestellt sind die verwendeten Substanzen und die dazugehörigen Hersteller.

Komponente	Hersteller
<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>	
Bisulfit-konvertierte CpGenome Universal Methylated DNA	Merck KGaA, DE
dNTP-Gemisch	Roche Applied Science, DE
FastStart <i>Taq</i> Polymerase	Roche Applied Science, DE
HiScript II Q RT SuperMix	Nanjing Vazyme Biotech Co, CN
Primer und Sonden	biomers.net GmbH, DE
NucleoSpin RNA Mini Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, DE
SYBR Green I	Biozym Scientific GmbH, DE
<b>Agarose Gelelektrophorese</b>	
Ethidiumbromid (EB)	Carl Roth GmbH, DE
LE Agarose	Biozym Biotech Trading GmbH, AT
Rotiphorese® 50× TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Carl Roth GmbH, DE
Rotiphorese® 20× TAE-Puffer	Carl Roth GmbH, DE
100 Basenpaare (BP) DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
1.000 BP DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Inc., US

---

### Immunhistochemie

Alexa Fluor 488 Donkey (anti-goat IgG)	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
Alexa Fluor 488 Goat (anti-mouse IgG)	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
Antigendemaskierungslösung	Agilent Technologies, Inc., US
BTLA-Antikörper (Klon: OT12E4)	OriGene Technologies GmbH, DE
CTLA-4-Antikörper (Klon: BSB-88)	Bio SB Inc., US
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
FACS-Puffer (DPBS + 4 % FKS + 2 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
Fetales Kälberserum (FKS)	Bio&SELL GmbH, DE
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierter, anti-human PD-L1 (Klon: 28-8)	Abcam, UK
LIVE/DEAD™ Kit mit fixierbarem	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
Nahinfrarot-Totzellen-Farbstoff	
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore, US

---

### 2.1.2 Geräte zur Durchführung der Experimente

#### Tab. 3 Geräte zur Durchführung der Experimente.

Dargestellt sind die verwendeten Geräte und die dazugehörigen Hersteller.

Geräte	Hersteller
<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>	
Galaxy Mini-Zentrifuge	VWR International GmbH, DE
HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH, DE
Mini-Laborzentrifuge MPS 1.000	Labnet International, Inc., US
Nano Photometer® N60	Implen GmbH, DE
SI-0256 Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., US
Thermocycler, peqSTAR 2X, VWR®	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
ThermoMixer® F2.0	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, DE
7500 Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Inc., US

---

### Agarose Gelelektrophorese

EOS 1300D	Canon Inc., JP
EV2650-Netzteil	Consort Medical PLC., UK
SUB15 Standard Submarine	Hoefer Inc., US
Transilluminator 20×20 M Basic	VWR International GmbH, DE
VMS-C4 Magnetrührer mit Heizplatte	VWR International GmbH, DE

---

### Durchflusszytometrie

FACSCanto™ Flow Zytometer	Becton, Dickinson and Company, US
FlowJo Software (Version 10.8.0)	Becton, Dickinson and Company, US
Multifuge 3 L-R gekühlte Zentrifuge	Thermo Heraeus Kendro, DE
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, DE

---

### Immunhistochemie

CV5030 Automatischer Glaseindeckautomat	Leica Biosystems, DE
DM IL LED Mikroskop	Leica Microsystems, DE
EG1150H Modulares Gewebeeinbettssystem	Leica Biosystems, DE
EG1150C Kühlplatte	Leica Biosystems, DE
HM 355S automatisches Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Inc., US
OLYMPUS IX50	Olympus K.K. , JP
ST5020 Multistainer Färbeautomat	Leica Biosystems, DE
Tissue-Tek VIP® 5 Jr Vakuum-Infiltrationsprozessor	Sakura Finetek Germany GmbH, DE
Ventana BenchMark Ultra Färbeautomat	Ventana Medical Systems, Inc., US

---

### 2.1.3 Verwendete Zellkulturmedien

#### Tab. 4 Medium für die Zelllinien aus dem HNSCC und UC.

Dargestellt sind die verwendeten Substanzen und die dazugehörigen Hersteller.

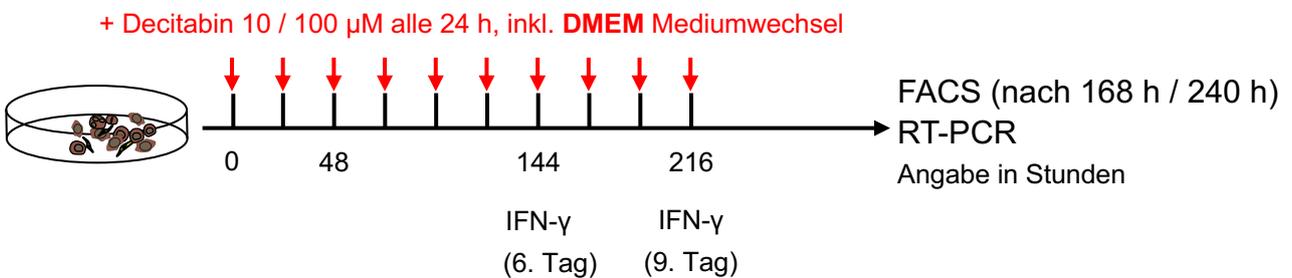
Komponente	Hersteller
Decitabin	Cell Guidance Systems LLC, US
Dulbecco-Modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) <sup>°</sup>	Thermo Fisher Scientific, US
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, US
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)*	Thermo Fisher Scientific, US
1 mM 2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, US
100 U/ml Penicillin und Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, US
1 mM Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, US
1 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)*	Thermo Fisher Scientific, US
10 % [v/v] FKS	Bio&SELL GmbH, DE

\* spezifische Komponente für UC-Zelllinien; ° spezifische Komponente für HNSCC-Zelllinien

## 2.2 Zellkulturexperimente

### 2.2.1 Behandlung von HNSCC-Zelllinien

Im Experimentierteil bezüglich der HNSCC wurden N= 2 HPV-positive (UPCI-SCC152 / CRL-3240, RRID:CVCL\_C058; UPCI:SCC154 / CRL-3241, RRID:CVCL\_2230) sowie N= 4 HPV-negative HNSCC-Zelllinien (FaDu / HTB-43, RRID:CVCL\_1218; SCC 193 / HSC-3, RRID:CVCL\_1288; SCC-25 / CRL-1628, RRID:CVCL\_1682; Detroit 562 / CLL 138, RRID:CVCL\_1171) verwendet. HSC-3 wurde von Merck KGaA (DE) erworben, die anderen Zelllinien wurden von ATCC (US) bezogen. Alle Zelllinien wuchsen adhärent in DMEM (**Tab.4**). Die Experimente dauerten jeweils sieben und zehn Tage unter täglichem Mediumwechsel. Zwei der Zellkulturflaschen wurden täglich mit 10  $\mu$ M beziehungsweise 100  $\mu$ M Decitabin behandelt, wovon eine Zellkulturflasche zusätzlich 24 Stunden vor der FACS-Analyse mit IFN- $\gamma$  (1.000 U/ml) versetzt wurde (**Abb.2**). Die Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

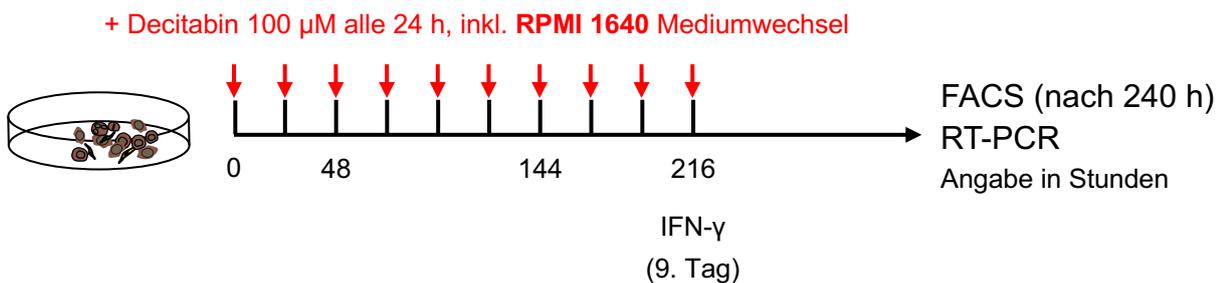


**Abb. 2 Exemplarischer Versuchsaufbau der Behandlung von HNSCC-Zelllinien mit Decitabin.**

### 2.2.2 Behandlung von UC-Zelllinien

Es wurden folgende humanen UC-Zelllinien des American Type Culture Collection (ATCC, USA) evaluiert: TCCSUP (RRID:CVCL\_1738), RT-112 (RRID:CVCL\_1670), T24 (RRID:CVCL\_0554) sowie RT-4 (RRID:CVCL\_0036). Zunächst wurden die Zelllinien unter täglichem Mediumwechsel in RPMI 1640 Medium kultiviert und über einen Zeitraum

von 240 Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  Decitabin inhibiert (**Tab. 4**). Unbehandelte Zelllinien unter 24-stündigem Mediumwechsel bildeten die Kontrolle zu den behandelten Zelllinien. Zusätzlich wurden die Zellkulturflaschen 24 Stunden vor der FACS-Analyse mit 1.000 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert (**Abb. 3**). Die Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank aufbewahrt.



**Abb. 3 Exemplarischer Versuchsaufbau der Behandlung von UC-Zelllinien mit Decitabin.**

### 2.3 Durchführung der Durchflusszytometrie

Nach erfolgreicher Waschung und Ablösung der Zellen aus dem Zellverband wurden diese mit FACS-Puffer versetzt. Die HNSCC- und UC-Zellen wurden mit dem LIVE/DEAD™ Kit mit fixierbarem Nahinfrarot-Totzellen-Farbstoff markiert und anschließend über 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Die genaue Detektion der oberflächlichen Expression erfolgte nach Koppelung mit dem PerCP/Cyanin5.5-markierten Antikörper an die Zielstruktur in einem Verhältnis von 1:100 im FACS-Puffer (**Tab. 2, Tab. 3**). Auf der Grundlage dieses Kopplungsprozesses konnten alle Zellen, die die Zielstruktur auf der Oberfläche exprimieren, detektiert und mit dem FACSCanto™ Flow Zytometer sowie der FlowJo Software ausgewertet werden (**Tab. 3**).

## 2.4 Durchführung der Immunhistochemie

### 2.4.1 Immunhistochemie von BTLA und CTLA-4

Zunächst wurden die Zellpellets gewonnen, in einen Paraffinblock eingebettet, geschnitten und die 4 µm dicken Dünnschnitte auf einen Objektträger aufgetragen. Im anschließenden Färbungsprozess wurden die Schnitte zunächst mit Xylol deparaffiniert, mit einer abnehmenden Ethanol-Serie rehydriert und zuletzt mit 550 mM Tris-gepufferter Kochsalzlösung (englisch „tris-buffered saline“, TBS) gewaschen. Die histologischen Schnitte wurden zur Antigen-Demaskierung zunächst mit Antigendemaskierungslösung (pH 6) für 10 min bei 100 °C im Dampfkocher inkubiert und folgend mit TBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen CTLA-4 (Verdünnung 1:50) beziehungsweise gegen BTLA (Verdünnung 1:1.000 UC; 1:2.000 HNSCC) bei 4 °C über Nacht (**Tab. 2, Tab. 3**). Mittels Dako REAL™ Link biotinylierter Sekundärantikörper wurde der Schnitt für 30 min bei Raumtemperatur und im weiteren Verlauf für 20 min mit alkalischer Phosphatase versetzt. Abschließend wurden BTLA und CTLA-4 als Zielstruktur visualisiert.

Die Proteinexpression wurde anhand des „H-Score“ von (Detre et al., 1995), quantifiziert. Die Anteile an nicht, schwach, mittelstark und stark gefärbten Tumorzellen, angegeben in Prozent, wurden unterschiedlich stark gewichtet (0- bis 3-fach), sodass sich ein Farbintensitätswert zwischen 0 bis 300 ergab (Detre et al., 1995). Ein durchschnittlicher H-Score aller Proben wurde berechnet und ein H-Score größer als der Durchschnitt als hohe Expression und ein H-Score gleich oder niedriger als der Durchschnitt als niedrige Expression gewertet. Tonsillengewebe wurde aufgrund der hohen Expression der Immuncheckpoints als Positivkontrolle verwendet.

### 2.4.2 Immunhistochemie von PD-L1

Die IHC der UC-Zelllinien wurden auf einem 4 µm dicken Dünnschnitt am Ventana BenchMark Ultra Färbeautomat durchgeführt (**Tab. 3**). Die PD-L1-Expression auf Tumoren und Immunzellen konnte mithilfe des anti-human PD-L1-Antikörper (Konzentration 1:50) dargestellt werden (**Tab. 2, Tab. 3**).

### 2.5 Durchführung Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde ausschließlich für die Verifizierung der verwendeten Primer verwendet. Die Herstellung eines 2 % Agarose-Gels erforderte 4 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer. Die Mixtur wurde bis zum Aufkochen erhitzt und anschließend mit 7 µl EB versetzt, bevor ein Gel gegossen wurde. 5 µl des Ladepuffers wurden mit den Proben versetzt und 10 µl dieses Gemisches in die Taschen des ausgehärteten Gels pipettiert (**Tab. 5**). 5 µl der Invitrogen® 100 bp DNA-Leiter wurden als Referenz verwendet. Alle Versuche liefen bei einer Spannung von  $U = 120 \text{ V}$ .

**Tab. 5 Übersicht Gelelektrophorese.**

<b>Puffer</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Volumen</b>
<b>Ladepuffer</b>	Bromphenolblau	0,04 g
	Doppelt destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	4,90 ml
	EDTA (0,5 M)	20,00 µl
	Glycerin	5,00 ml
	Xylencyanol	0,04 g

## 2.6 RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA

### 2.6.1 RNA-Isolation aus generierten Zellpellets

Nach der Gewinnung der Zellpellets aus der Zellkultur, wurde die RNA mittels NucleoSpin RNA Mini Kit und dem Protokoll des Herstellers folgend umgeschrieben (**Tab. 3**). Dieser Prozess beinhaltet unter anderem die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, 70 % Ethanol und die abschließende Lösung in RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Nach erfolgreicher Gewinnung der RNA wurde die Konzentration mittels NanoPhotometer® N60 in ng/ $\mu$ l bestimmt (**Tab. 3**).

### 2.6.2 Umschreibung von RNA in cDNA

Die Quantifizierung und Bestimmung der mRNA-Expression von *PD-L1*, *CTLA4*, *LAG3* beziehungsweise *BTLA* in den Zelllinien erfolgte nach Umschreibung der RNA in cDNA. Nach erfolgreicher Einmessung der RNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l wurde die RNA auf 1.000 ng/ $\mu$ l verdünnt und mit destilliertem Wasser (englisch „distilled water“, dH<sub>2</sub>O) und 2  $\mu$ l des HiScript II Q RT SuperMix für die qPCR versetzt (**Tab. 2**). Die eigentliche Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mittels in **Tab. 3** aufgeführten Komponenten und mit den in **Tab. 6** dargestellten Temperaturen im Thermocycler.

**Tab. 6 Temperatur-Zeit-Programm für die Umschreibung von RNA in cDNA.**

	Temperatur	Zeit
Deckeltemperatur	110 °C	
	25 °C	10 min
	42 °C	30 min
	85 °C	5 min
Aufbewahrung cDNA	4 °C	

## 2.7 Durchführung der qRT-PCR

### 2.7.1 Primertest für die qRT-PCR

Die Durchführung des qRT-PCR-Primertest erfolgte mit verschiedenen Komponenten (**Tab.7**, **Tab.8**). Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Nach dem erfolgreichen Pipettieren in die 96-Loch-Mikroplatte und anschließender Zentrifugation, wurde die PCR mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt (**Tab. 9**).

**Tab. 7 qRT-PCR Mastermix Zusammensetzung (5 µl).**

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	3,044 µl
Glycerin	0,800 µl
KCl (3 M)	0,330 µl
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	0,120 µl
ROX-Lösung	0,006 µl
Tris pH 8,4 (1 M)	0,700 µl

**Tab. 8 qRT-PCR Reaktionsmix Zusammensetzung (20 µl).**

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	3,38 µl
dNTP-Gemisch (10 mM je dNTP)	0,50 µl
FastStart <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0,30 µl
Templat-DNA (0,2 ng / µl, 0,1 ng/µl)	10,00 µl
Primer-F (50 µM)	0,16 µl
Primer-R (50 µM)	0,16 µl
qPCR Master Mix ( <b>Tab. 7</b> )	5,00 µl
SYBR Green I (1:1.000 in H <sub>2</sub> O)	0,50 µl

**Tab. 9 Thermocycler-Programm für die qRT-PCR.**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Rate	
Aktivierung	95 °C	20 min	100 %	45 Zyklen
Anlagerungstemperatur	58 / 60 / 62 °C	60 s	100 %	
Denaturierung	95 °C	15 s	75 %	

### 2.7.2 Detektion der individuellen mRNA-Expressionsprofile

Die qRT-PCR ermöglicht eine individuelle Bestimmung der *CTLA4* / *LAG3* mRNA Expressionsprofile in HNSCC-Zelllinien und der Tonsille als Referenz. Die Quantifizierung der totalen mRNA wurde mittels fünf Haushaltsgenen  $\beta$ -Aktin (englisch „actin beta“, *ACTB*), 5'-Aminolävulinsäure-Synthase 1 (englisch „5'-aminolevulinate synthase 1“, *ALAS1*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (englisch „glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“, *GAPDH*), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (englisch „hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1“, *HPRT1*), Succinat-Dehydrogenase-Komplex Flavoprotein-Untereinheit A (englisch „succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A“, *SDHA*) bestimmt (**Tab. 10**).

Die Versuchsdurchführung basiert auf den Arbeitsschritten und Materialien wie unter **2.7.1** beschrieben. Die Templat-DNA (**Tab. 8**) wurde durch 5  $\mu$ l der Zelllinien-spezifischen cDNA ersetzt.  $\Delta$ CT-Werte wurden folgendermaßen berechnet:

$$\Delta CT_{Probe} = CT_{Haushaltsgene} - CT_{CTLA4 / BTLA / LAG3}.$$

Verwendet wurde der Median aller fünf Haushaltsgene ( $CT_{Haushaltsgene}$ ).

**Tab. 10 Spezifische Primer der qRT-PCR mit individuellen Temperaturen.**  
Verwendete Sequenz mit der Kombination von Vorwärts- / Rückwärtsprimer von 5' → 3' und der Assay-spezifischen Anlagerungstemperatur (in °C).

<b>Gen</b> (Anlagerungs- temperatur in °C)	<b>Vorwärtsprimer</b> (5' → 3')	<b>Rückwärtsprimer</b> (5' → 3')	<b>Sonde</b> (5' → 3') <sup>‡</sup>
<b>CTLA4</b> 62 °C	0,4 µM CTCATGTACCCAC CGCCATACT	0,4 µM TTGATGGGAATAAAA TAAGGCTGAA	0,2 µM 6-FAM-CAGATTTATGTAATTG ATCCAGAACCGTGCC-BHQ-1
<b>BTLA</b> 62 °C	0,4 µM GAAAGCAAAATG AACTCTCTGACA	0,4 µM ACAAAGGTCAGGGT CATTATCAT	0,2 µM 6-FAM-CCTGGTTGATGCTC ACCTTAAGAG-BHQ-1
<b>LAG3</b> 62 °C	0,4 µM CCTACAGAGATG GCTTCAACGTC	0,4 µM GGAACCTGCTCCAG CGTACA	0,2 µM 6-FAM-CTCACTGTTCTG GGTCTGGAGCCC-BHQ-1
<b>ACTB</b> 58 °C	0,2 µM ATGTGGCCGAGG ACTTTGATT	0,2 µM AGTGGGGTGGCTTT TAGGATG	0,16 µM HEX-GAAATRMGTKGTTA CAGGAAGTCCCT-BHQ-1
<b>ALAS1</b> 62 °C	0,2 µM TAATGACTACCTA GGAATGAGTCG	0,2 µM CCATGTTGTTTCAA GTGTCCA	0,16 µM 6-FAM-TAACTGCCCCACA CACCCGT-BHQ-1
<b>GAPDH</b> 58 °C	0,2 µM TGCACCACCAAC TGCTTAGC	0,2 µM GGCATGGACTGTGG TCATGAG	0,16 µM 6-FAM-CTGGCCAAGGTCA TCCATGACAACT-BHQ-1
<b>SDHA</b> 62 °C	0,2 µM TCGCTCTTGGAC CTGGT	0,2 µM TGGAGGGACTTTATC TCCAG	0,6 µM 6-FAM-ATCGAAGAGTCA TGCAGGCC-BHQ-1
<b>HPRT1</b> 62 °C	0,2 µM TGACACTGGCAA AACAAATGCA	0,2 µM GGTCCTTTTACCA GCAAGCT	0,16 µM 6-FAM-TGCTTTCCTTGGT CAGGCAGTAT-BHQ-1

<sup>‡</sup> Wobble-Basen: R – A/G, M – A/C, K – G/T

## **2.8 Bisulfitierung und Durchführung einer quantitativen methylierungsspezifischen PCR**

### **2.8.1 Bisulfitierung und Aufreinigung der gewonnenen DNA**

Die Bisulfitierung der DNA für die anschließende Analyse von Methylierungsmustern beginnt mit der Lyse von pelletierten Zellen aus den durchgeführten Zellkulturexperimenten. Zunächst wurden 100 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K (**Tab. 11**) zu den Zellpellets hinzugefügt und anschließend bei 60 °C und 1.000 rpm im Thermomixer für 3 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden für die Bisulfitumwandlung 100 µl des Probenlysats mit 100 µl Bisulfitreagenz und 50 µl Denaturierungspuffer (**Tab. 11**) gemischt und kurz abgekühlt. Die Mischung wurde dann für 45 min bei 85 °C und 1.000 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA mit 500 µl Bindungspuffer auf eine NukleoSpin Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl Waschpuffer gewaschen (**Tab. 11**). Im Anschluss wurden 700 µl Desulphonierungspuffer hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (**Tab. 11**). Abschließend wurde die DNA mit 50 µl Elutionspuffer mittels Zentrifugation eluiert, um sie für weitere Experimente verfügbar zu machen (**Tab. 11**).

### **2.8.2 Auswahl der analysierten CpG-Stellen**

Die Auswahl der analysierten CpG-Stellen erfolgte gezielt auf Basis ihrer bekannten prädiktiven Relevanz in anderen Tumorentitäten. Insbesondere wurden CpG-Stellen berücksichtigt, die in früheren Studien bei Melanomen und Nierenzellkarzinomen mit einem prädiktiven Wert für das Ansprechen auf Immuntherapien assoziiert waren (Fietz et al., 2021; Goltz et al., 2018; Klümper et al., 2021). Diese Stellen wurden mithilfe öffentlich zugänglicher Datenbanken und relevanter Literatur identifiziert. Zusätzlich wurde die Lage der CpG-Stellen in regulatorischen Regionen wie Promotoren, Promotorflanken und Genkörpern berücksichtigt, da diese Bereiche als Hotspots für epigenetische Regulation bekannt sind. Ziel war es, sich auf funktionell relevante

Regionen zu fokussieren, um trotz begrenzter Stichprobengröße, statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

### 2.8.3 qMSP von LAG3

Die zur Methylierungsanalyse verwendete DNA der HNSCC-Zelllinien wurde gemäß Anleitung einer Bisulfitierung unterzogen und anschließend gereinigt. Der individuelle  $C_T$ -Wert wurde als methylierungsspezifischer Wert verwendet und die qMSP ist unter folgenden Bedingungen durchgeführt worden (**Tab. 13**). Die relativen DNA-Methylierungs-Level wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Methylierung [\%]} = 100 \% / [1 + 2^{C_T \text{ methylierte Sonde (PM)} - C_T \text{ unmethylierte Sonde (PU)}].$$

**Tab. 11 Komponente und Hersteller für die Bisulfitierung und Aufreinigung.**

Komponente	Zusammensetzung	Hersteller
Bindepuffer	50 % [v/v] GTC	AppliChem GmbH, DE
	50 % [v/v] Ethanol	AppliChem GmbH, DE
Desulphonierungspuffer	25 % [v/v] NaOH	AppliChem GmbH, DE
	75 % [v/v] Ethanol	AppliChem GmbH, DE
Lysepuffer	Lysepuffer	AppliChem GmbH, DE
Elutionspuffer	1 % [v/v] 1 M Tris, pH 8,0	AppliChem GmbH, DE
	99 % [v/v] H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
Proteinkinase K Lösung	2 % [w/v] mg Proteinkinase K in H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, DE
Waschpuffer	10 % [v/v] Trizma <sup>®</sup> HCl, pH 7,4, 1 M	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE
	99 % [v/v] H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, DE

**Tab. 12 Primer und Proben für die qMSP von *LAG3*.**

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz
<b>LAG3</b>	LAG3-F	5'-CCCCAAAATCTCTCAAAACCT-3'
	LAG3-R	5'-GGAATTAATGTATAGAGGTTGGG-3'
	LAG3-PU	5'-HEX- ACTCCTTCAACCACCCTAACCAC-BHQ-1-3'
	LAG3-PM	5'-6-FAM- CTTCAACCGCCCTAACCGC-BHQ-1-3'

**Tab. 13 qMSP-Komponente (20 µl).**

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	8,64 µl
dNTP-Gemisch (10 mM)	0,50 µl
FastStart <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0,30 µl
HNSCC DNA Probe (4 ng/µl)	5,00 µl
Primer-F (50 µM)	0,16 µl
Primer-R (50 µM)	0,16 µl
qPCR Mastermix ( <b>Tab. 7</b> )	5,00 µl
Sonde (PM) (50 µM)	0,12 µl
Sonde (PU) (50 µM)	0,12 µl

**Tab. 14 Thermocycler Programm für die qMSP von *LAG3*.**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
1.	95 °C	20 min	45 Zyklen
2.	95 °C	15 s	
	62 °C	2 s	
	60 °C	60 s	

### 2.8.4 qMSP von *CTLA4*

In diesem Versuchsabschnitt wurde die qMSP genutzt, um die individuelle Quantifizierung der *CTLA4*-Kopien zu untersuchen. Als Referenz zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurde hier eine CpG-freie Region im *ACTB*-Genlocus mit den *CTLA4* qMSP-Daten

verwendet.

Die Berechnung des quantitativen Methylierungs-Scores (englisch „quantitative methylation score“, QMS) gelingt mit einer modifizierten  $\Delta\Delta CT$  von (Kneip et al., 2011).

$$CTLA4\text{-Methylierung [\%]}: 100 * 2^{-[(CTLA4 \text{ Probe} - ACTB \text{ Probe}) - (CTLA4 \text{ Median} - ACTB \text{ Median})]}$$

Als Kalibratorprobe diente die mit Bisulfit behandelte CpGenome universal methylierte DNA (**Tab. 2**). Diese DNA diente als Referenzprobe, um die Quantifizierung der DNA-Methylierung in den Proben zu kalibrieren. 30 ng Templat-DNA wurden für jede PCR verwendet und die Proben 3x vergemessen. **Tab. 15** zeigt in Kombination mit **Tab. 13** die benötigten Komponenten und **Tab. 16** das verwendete Temperaturprofil.

**Tab. 15 Primer und Sonden für die qMSP von *CTLA4* und *ACTB*.**

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz
<b><i>CTLA4</i></b>	CTLA4-P	6-FAM-AAGTCGTGGGTTTAGTTGTTAC-BHQ-1
	CTLA4-F	5'-TACTTAAAATTATCTTTTCGACG-3'
	CTLA4-R	5'-GTTTTTTTGTGTTTGGTTTTACGA-3'
<b><i>ACTB</i></b>	ACTB-P	ATTO-647NACCACCACCCAACACACAATAACA AACACA-BHQ-2
	ACTB-F	5'-CCCTTAAAAATTACAAAAACCACAA -3'
	ACTB-R	5'-GGAGGAGGTTTAGTAAGTTTTTTG -3'

**Tab. 16 Thermocycler-Programm für die qMSP von *CTLA4*.**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
1.	95 °C	20 min	40 Zyklen
2.	95 °C	15 s	
	62 °C	2 s	
	58 °C	60 s	

## 2.9 Patientenkollektive

### 2.9.1 Patienten UKB ICB / Nicht-ICB Patientenkollektiv

#### **UKB HNSCC Nicht-ICB Patientenkollektiv:**

Die UKB Nicht-ICB Patientenkollektiv umfasst N= 138 histopathologisch bestätigte Patienten mit HNSCC, die keine ICB-Behandlung erhalten haben (Sailer et al., 2019). Alle Patienten wurden zwischen 2011 und 2018 am Universitätsklinikum Bonn (UKB) behandelt (**Tab. 17**).

#### **UKB HNSCC ICB Patientenkollektiv:**

Dieses Patientenkollektiv inkludiert die Patienten, die als Therapieverfahren eine ICB-Behandlung zwischen 2015 und 2020 erhalten haben (**Tab. 17**). Überlebensdaten waren von N= 29 Patienten vorhanden und umfassten PFS und OS. Die Studie wurde von dem Ethikrat des UKBs genehmigt (Nummer 187/16).

**Tab. 17 Spezifische Übersicht UKB HNSCC Nicht-ICB / ICB-Patientenkollektiv (UKB Nicht-ICB / ICB Patienten).** Beide Patientenkollektive sind nach Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Tumorlokalisation und HPV-Status (im Fall eines Oropharynxkarzinom) aufgeteilt. Das UKB HNSCC-ICB-Patientenkollektiv wird zusätzlich in die Kategorien der individuellen ICB-Behandlung, der Antwort auf die ICB-Behandlung und der immunologisch bedingten Ereignisse unterteilt.

**Tab. 17** ist in modifizierter Form der Publikation von (Hoffmann et al., 2023) entnommen.

	UKB Nicht-ICB Patienten Anzahl <i>N</i> (%)	UKB ICB Patienten Anzahl <i>N</i> (%)
<b>Alle Patienten</b>	138	29
<b>Alter [Jahr] (Spanne)</b>	62,5 (32-89)	62,3 (31-81)
<b>Geschlecht</b>		
Weiblich	24 (18,0)	9 (31,0)
Männlich	115 (82,7)	20 (69,0)
<b>Stadium (UICC)</b>		
I	21 (15,2)	0 (0)
II	22 (15,9)	0 (0)
III	34 (24,6)	0 (0)
IV	61 (44,2)	29 (100)
<b>Tumor Lokalisation</b>		
Oropharynx	60 (43,5)	10 (34,5)
Larynx	31 (22,5)	1 (3,4)
Hypopharynx	21 (15,2)	4 (13,8)
Mundhöhle	18 (13,0)	8 (27,6)
Nasennebenhöhle	4 (2,9)	-
Unbekannte Lokalisation	4 (2,9)	6 (20,7)

---

**HPV-Status im Oropharynxkarzinom**

Positiv	27 (45,0)	1 (10,0)
Negativ	32 (53,3)	6 (60,0)
Unbekannt	1 (1,7)	3 (30,0)

---

**ICB-Wirkstoff**

Cemiplimab	-	1 (3,4)
Nivolumab	-	27 (93,1)
Nivolumab + Ipilimumab	-	1 (3,4)

---

**Ansprechen auf ICB**

Partielle Remission (PR)	-	4 (13,8)
Stabile Erkrankung (SD)	-	7 (24,1)
Krankheitsprogression (PD)	-	15 (51,7)
Unbekannt	-	3 (10,3)

---

**Immunbedingte Nebenwirkungen**

Colitis	-	1 (3,5)
Hepatitis	-	1 (3,5)
Pneumonie	-	2 (6,9)
Dermatitis und / oder Mukositis	-	3 (10,3)
Keine	-	21 (72,4)
Unbekannt	-	2 (6,9)

---

**2.9.2 Kollektiv der mUC-Patienten**

Das mittlere Alter der Patienten im mUC-Kollektiv betrug 67 Jahre bei einem Interquartilsabstand (englisch „interquartile range“, IQR) von 58 bis 74 (Klümper et al., 2023). 77 % der Patienten waren männlich (Klümper et al., 2023). Die Patienten erhielten entweder eine Therapie mit PD-1-Antikörpern (75 %) oder mit PD-L1-Antikörpern (25 %) (Klümper et al., 2023). Histologisch konnten N= 106 Fälle dem mUC zugeordnet werden

(N= 1 neuroendokrines Karzinom der Blase), wobei 23 % der Patienten ein UC mit Plattenepitheldifferenzierung und 57 % die typische Morphologie des UC aufwiesen (Klümper et al., 2023).

In der folgenden Tabelle (**Tab. 18**) werden die demografischen und klinischen Merkmale der Teilnehmer zusammengefasst, die in einer Studie zur Behandlung des mUC mit Immuntherapie untersucht wurden (Tully et al., 2021; Klümper et al., 2023).

**Tab. 18 Spezifische Übersicht der mUC-Patienten.**

Übersicht der mUC-Patienten: Alter, Geschlecht, ECOG-Status, ICB-Inhibitor, Therapielinie, Raucherstatus, Histologie, histologische Variante und Proteinsubtyp.

**Tab. 18** ist in modifizierter Form der Publikation von (Klümper et al., 2023), entnommen.

Eigenschaft	Patienten (N [%], Median [IQR])
<b>Gesamtzahl Patienten</b>	107 (100 %)
<b>Alter [Jahre] (Spanne)</b>	67 (58-74)
<b>Geschlecht</b>	
Weiblich	25 (23 %)
Männlich	82 (77 %)
<b>ECOG-Status</b>	
0	86 (80 %)
≥1	21 (20 %)
<b>ICB-Inhibitor</b>	
PD-1-Inhibitor (Nivolumab, Pembrolizumab)	79 (75 %)
PD-L1-Inhibitor (Atezolizumab, Durvalumab)	26 (25 %)
Unbekannt	2

**Therapielinie**

Erstlinientherapie	34 (32 %)
Zweitlinientherapie	73 (68 %)

---

**Raucherstatus**

Nichtraucher	44 (54 %)
Raucher	37 (46 %)
Unbekannt	26

---

**Histologie**

Neuroendokrin	1 (1 %)
Urothel	106 (99 %)

---

**Histologische Variante**

Plattenepithel	25 (23 %)
Nicht näher spezifiziert	61 (57 %)
Andere	21 (20 %)

---

**Proteinsubtyp**

Basal	32 (30 %)
Luminal	75 (70 %)

---

**FGFR3-Veränderung**

Verändert	16 (15 %)
Wildtyp	91 (85 %)

**PD-L1 Expression**

PD-L1 auf Immunzellen (Median, Spanne)	1 (0-5)
PD-L1 TPS (Median, Spanne)	0 (0-12)
PD-L1 CPS (Median, Spanne)	5 (0-40)
PD-L1 CPS	
CPS < 10 %	64 (60 %)
CPS ≥ 10 %	43 (40 %)
Stromale tumorinfiltrierende Lymphozyten (Median, Spanne)	5 (2-20)
membranständiger PD-L1 (Median, Spanne)	9 (4-17)

---

**2.10 Statistik**

Die statistische Analyse wurde mit dem IBM SPSS Statistikprogramm Version 27 (IBM, US) durchgeführt. Korrelationen wurden mittels Spearman's Rank-Korrelation (Spearman's  $\rho$ ) berechnet, während individuelle Gruppenvergleiche mittels t-test oder Kruskal-Wallis Test (>2 Gruppen) ermittelt wurden. Kaplan-Meier-Modelle und Cox-Regression wurden für die Überlebensanalysen verwendet. Das PFS ist definiert als die Zeit zwischen erster Gabe des Immuncheckpoint Inhibitor und dem dokumentierten Datum der Krankheitsprogression. Das OS beschreibt die Zeit zwischen initialer Diagnosestellung oder Beginn der ICB und letztem Kontakt beziehungsweise Tod des Patienten. Die DNA-Methylierungswerte wurden bei der Kaplan-Meier-Analyse mittels hinsichtlich niedriger p-Werte optimierten Schwellenwerts dichotomisiert. P-Werte beruhen auf den Log-Rank-Tests. Zweiseitige p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

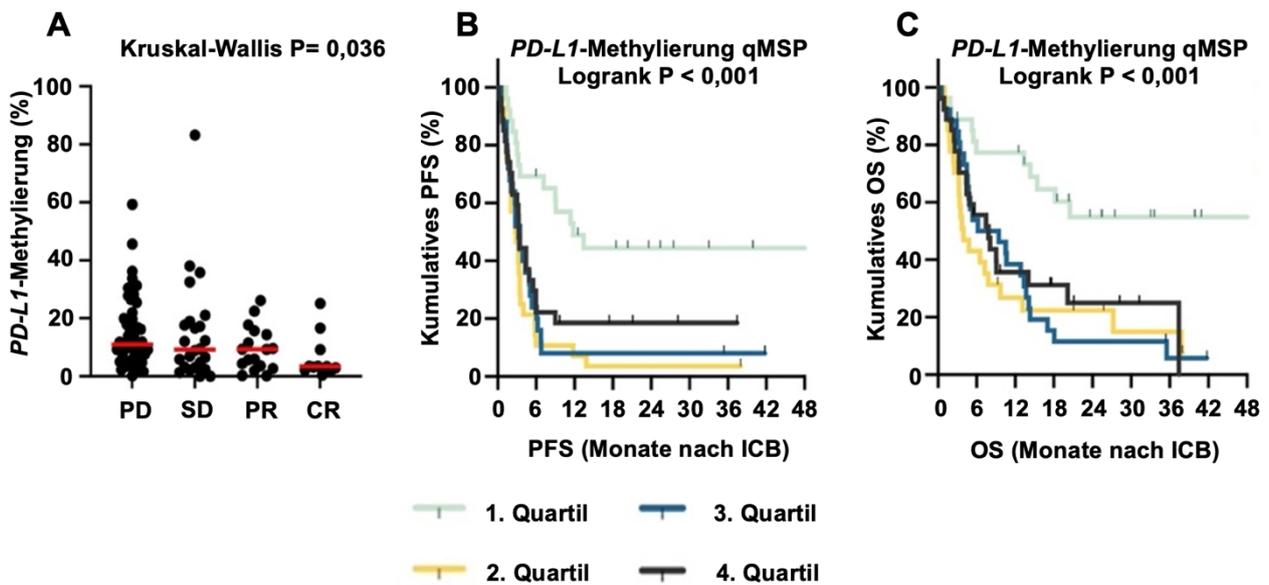
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Signifikanz von PD-L1 im mUC

##### 3.1.1 PD-L1-Promotor-Hypomethylierung als prädiktiver Biomarker für das immuntherapeutische Ansprechen und Überleben bei mUC

In diesem Abschnitt wurde die Methylierung von *PD-L1* hinsichtlich des Therapieansprechens von Patienten mit mUC untersucht. Das Therapieansprechen wurde radiologisch mittels der RECIST 1.1 Kriterien beurteilt. Die Daten in **Abb. 4A** illustrieren, dass Patienten mit CR des mUC die niedrigsten *PD-L1*-Methylierungslevel aufweisen (IQA: 2,12 bis 9,20 %) (Klümper et al., 2023). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine niedrige *PD-L1*-Methylierung mit einem besseren objektiven Ansprechen auf die Immuntherapie korreliert (Klümper et al., 2023). Die univariable Cox-Regression analysierte den Zusammenhang zwischen der *PD-L1*-Methylierung als kontinuierlicher Variable und PFS sowie OS. Dabei zeigte sich ein statistischer Trend zu einer Assoziation zwischen höherer *PD-L1*-Methylierung und schlechterem Überleben (PFS: HR= 1,01 [95 %-CI 1,00 – 1,03], p= 0,079; OS: HR= 1,01 [95 % -CI 1,00 bis 1,03], p= 0,072) (Klümper et al., 2023). Es ist wichtig zu betonen, dass diese Analyse nicht auf einem Vergleich spezifischer Gruppen basiert (z. B. Quartile), sondern die Methylierungswerte als kontinuierliche Variable betrachtet wurden.

Zur weiteren Analyse wurden die Patienten basierend auf ihrem *PD-L1*-Methylierungsstatus in vier Quartile eingeteilt, wobei das erste Quartil die niedrigste und das vierte Quartil die höchste *PD-L1*-Methylierung repräsentierte. Die Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung **4B** und **4C** zeigen, dass Patienten im ersten Quartil (niedrigste *PD-L1*-Methylierung) ein signifikant besseres PFS und OS aufwiesen als Patienten in den anderen drei Quartilen (PFS: HR= 2,93 95 %-CI: 1,66–5,16, p < 0,001; OS: HR= 3,39 95 %-CI: 1,78–6,45, p < 0,001)(Klümper et al., 2023). Diese Ergebnisse verdeutlichen den prognostischen Wert einer niedrigen *PD-L1*-Methylierung für ein verlängertes Überleben unter Immuntherapie (Klümper et al., 2023).

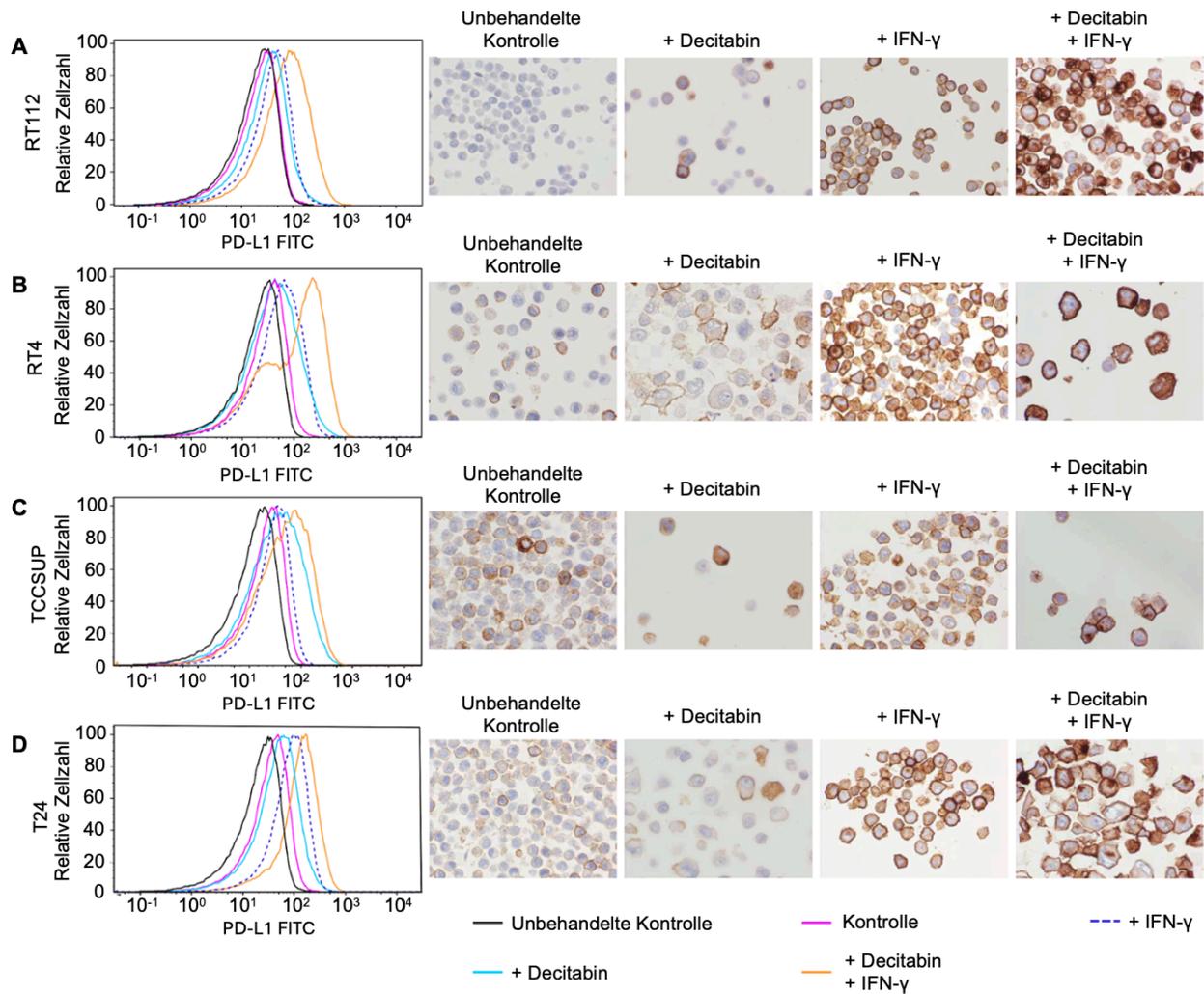


**Abb. 4 Immuntherapeutisches Ansprechen und Überleben in Abhängigkeit vom *PD-L1*-Methylierungsstatus im mUC.**

**A:** Verteilung der *PD-L1*-Methylierung in Assoziation mit dem therapeutischen Ansprechen: PD, SD, PR und CR. **B:** Kaplan-Meier-Kurve des PFS, stratifiziert nach Quartilen basierend auf dem *PD-L1*-Methylierungsstatus. **C:** Kaplan-Meier-Kurve des OS nach Therapiebeginn, stratifiziert nach Quartilen basierend auf dem *PD-L1*-Methylierungsstatus. **Abb. 4A-C** ist in modifizierter Form der Publikation von (Klümpfer et al., 2023), entnommen.

### 3.1.2 Pharmakologische Demethylierung von UC-Zelllinien

Für die Analyse der biologischen Relevanz der *PD-L1*-Methylierung in UC-Zellen, wurde *in vitro* nachgewiesen, dass eine pharmakologische Demethylierung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin, insbesondere in Kombination mit IFN- $\gamma$ , eine Hochregulierung der oberflächlichen *PD-L1*-Expression zur Folge hat (Klümpfer et al., 2023). Besonders prominent ist die Ausprägung in den UC-Zelllinien RT4 und RT112, welche in der unbehandelten Kontrolle eine sehr schwache bis keine Expression von *PD-L1* aufweisen (Klümpfer et al., 2023). Die pharmakologische Demethylierung steigert somit die *PD-L1*-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$  Induzierbarkeit in UC-Zelllinien (**Abb. 5**) (Klümpfer et al., 2023).



**Abb. 5** Pharmakologische Demethylierung steigert die PD-L1-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$ -Induzierbarkeit in UC-Zelllinien.

Histogramme und PD-L1 IHC zeigen die Expression von PD-L1 in pharmakologisch-demethylierten UC-Zelllinien (A: RT112; B: RT4; C: TCCSUP; D: T24), mit und ohne IFN- $\gamma$ -Stimulation, verglichen mit unbehandelten Zelllinien (Klümper et al., 2023).

**Abb. 5** ist in modifizierter Form der Publikation von (Klümper et al., 2023), entnommen.

### 3.2 Analyse der DNA-Methylierung der Gene *CTLA4* und *LAG3* in der mUC-Kohorte

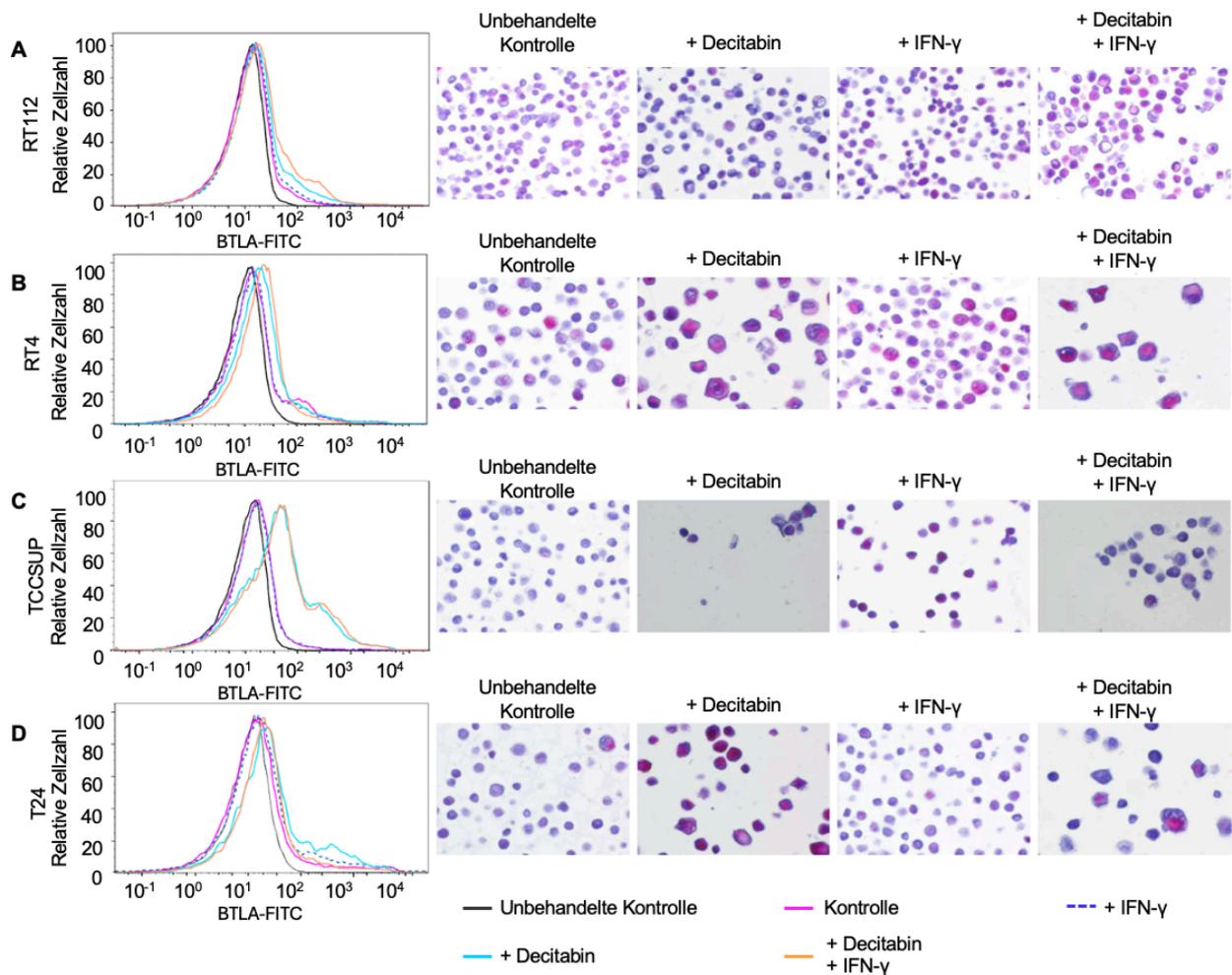
In der mUC-Kohorte (**Tab. 18**) wurde die Signifikanz der DNA-Methylierung der Gene *CTLA4* und *LAG3* im Zusammenhang mit dem Therapieansprechen untersucht. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung von *CTLA4* und *LAG3* sowie den klinischen Endpunkten PFS und OS festgestellt werden.

Für die Methylierung des Gens *LAG3* ergaben sich folgende Ergebnisse: PFS (HR= 1,02; 95 %-CI 0,99–1,06, p= 0,27) und OS (HR= 1,03 95 %-CI 1,00–1,06, p= 0,083). Ähnlich verhielt es sich bei der Analyse der *CTLA4*-Methylierung: Für das PFS (HR= 0,99 95 %-CI 0,98–1,01, p= 0,41) und das OS (HR= 1,00 95 %-CI 0,99–1,01, p= 0,81).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass weder die DNA-Methylierung von *CTLA4* noch von *LAG3* in dieser Kohorte einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen oder die Überlebensparameter hatte.

### 3.3 BTLA-Expression in UC-Zelllinien

Der nachfolgende Versuchsabschnitt veranschaulicht die Expression von BTLA in Zelllinien des UC in Abhängigkeit von der Decitabin-Behandlung. Auffallend ist, dass alle untersuchten Zelllinien, besonders die Zelllinien TCCSUP und RT4, unter dem Einfluss von Decitabin verstärkt BTLA oberflächlich exprimieren (**Abb. 6**). Die Zelllinie RT4 zeigt exemplarisch, unter Demethylierung und IFN- $\gamma$  Induktion, immunhistochemisch eine Größenzunahme und eine vermehrte oberflächliche BTLA-Expression.



**Abb. 6 Pharmakologische Demethylierung steigert die BTLA-Expression und erhöht die IFN-γ Induzierbarkeit in UC-Zelllinien.**

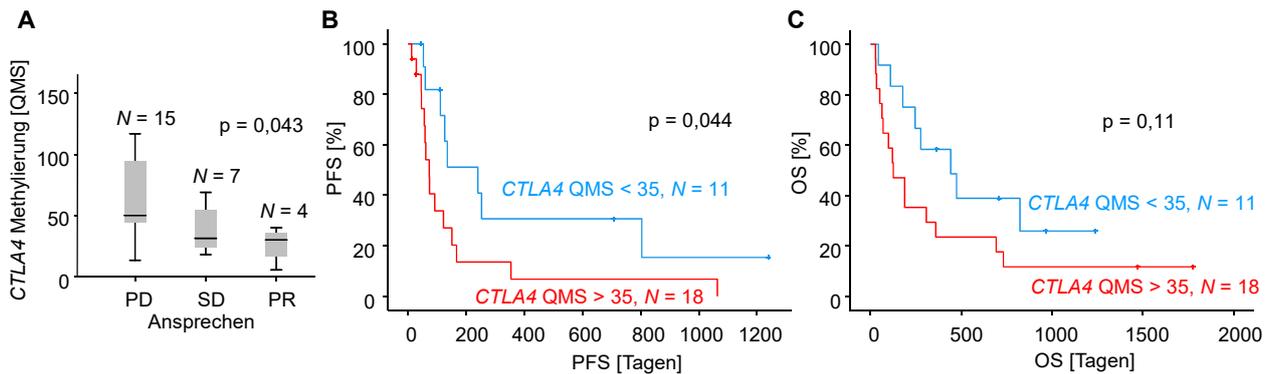
Expression von BTLA in pharmakologisch demethylierten UC-Zelllinien (A: RT112; B: RT4; C: TCCSUP; D: T24), sowohl bei Zugabe als auch ohne Zugabe von IFN-γ, im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien.

### 3.4 Bedeutung von CTLA-4 in HNSCC

#### 3.4.1 Klinische Relevanz der *CTLA4*-Promotormethylierung in HNSCC

In Cox-Analysen von HNSCC Tumorpatienten (N= 138), die keine ICB erhalten haben, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der *CTLA4*-Methylierung und dem OS (HR= 1,01 [95 % CI 0,98-1,03], p= 0,67) (Hoffmann et al., 2023).

Dazu wurde der *CTLA4*-Methylierungsstatus in prätherapeutischen Proben von N= 29 Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasierendem HNSCC unter ICB bestimmt, um die genaue Bedeutung von *CTLA4* zu untersuchen (Hoffmann et al., 2023). Die Patienten wurden mit dem anti-PD-1-Inhibitor Nivolumab (N= 27), Cemiplimab (N= 1) oder einer Kombination aus Nivolumab und dem anti-CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab (N= 1) behandelt und der Verlauf über fünf Jahre untersucht (Hoffmann et al., 2023). Von den 29 oben genannten Patienten hatten 15 Patienten einen PD, sieben einen SD und vier Patienten ein PR nach ICB-Behandlung und drei Patientenverläufe waren nicht verifizierbar (**Abb. 7A**) (Hoffmann et al., 2023). Das Therapieansprechen wurde radiologisch mittels der RECIST 1.1 Kriterien beurteilt. In diesem Patientenkollektiv wurde festgestellt, dass die *CTLA4*-Hypermethylierung signifikant mit einem schlechten Ansprechen auf die ICB-Behandlung korreliert (p= 0,043) (**Abb. 7A**) (Hoffmann et al., 2023). Zudem wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse die Assoziation der *CTLA4*-Methylierung mit dem PFS ermittelt und zeigt, dass Patienten mit niedriger *CTLA4*-DNA-Methylierung ein deutlich längeres PFS (p= 0,044) (**Abb. 7B**) als Patienten mit einer hohen *CTLA4*-DNA-Methylierung aufweisen (Hoffmann et al., 2023). In Bezug auf das OS konnten wir keinen statistisch signifikanten Effekt beobachten, jedoch lässt sich anhand des Verlaufs der Kaplan-Meier-Überlebenskurven vermuten, dass eine niedrigere *CTLA4*-Methylierung mit einem längeren OS korreliert und bei einer höheren Patientenzahl eine statistische Signifikanz erreicht werden würde (**Abb. 7C**) (Hoffmann et al., 2023).



**Abb. 7 Zusammenhang zwischen der CTLA4-DNA-Methylierung und dem Therapieansprechen, PFS und OS von HNSCC-Patienten unter ICB-Behandlung.**

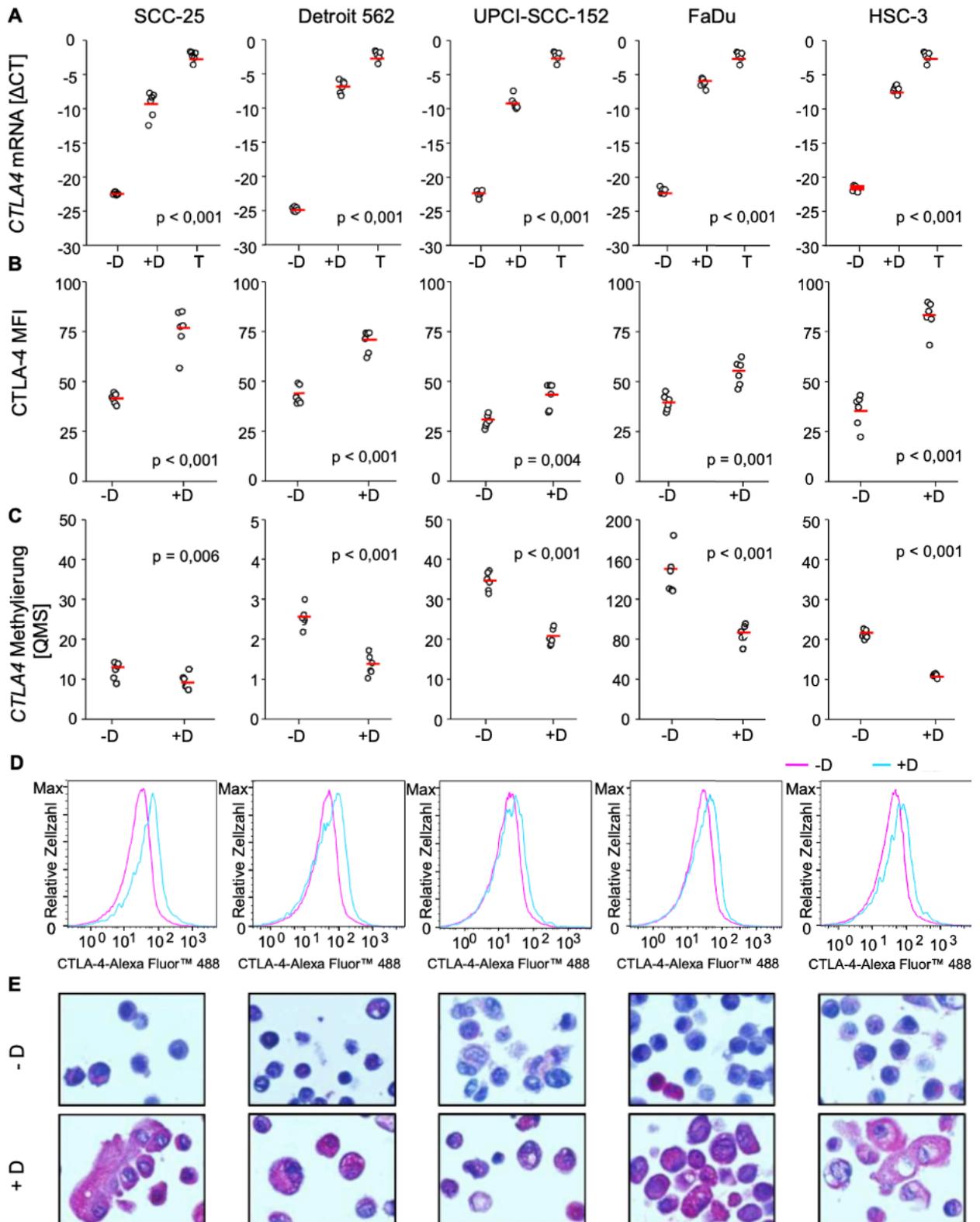
**A:** Zusammenhang zwischen der CTLA4-DNA-Methylierung und dem Therapieansprechen (PD, SD, PR) im Patientenkollektiv von N= 26 ICB-behandelten HNSCC-Patienten. **B:** Kaplan-Meier-Analyse des PFS bei HNSCC-Patienten, stratifiziert nach CTLA4-Methylierung in Proben vor der ICB-Behandlung. Die Dichotomisierung erfolgte anhand des optimalen Schwellenwerts. **C:** Kaplan-Meier-Analyse des OS bei HNSCC-Patienten, stratifiziert nach CTLA4-Methylierung in Proben vor der ICB-Behandlung. Die Dichotomisierung erfolgte anhand des optimalen Schwellenwerts. **Abb. 7 A-C** ist in modifizierter Form der Publikation von (Hoffmann et al., 2023) entnommen.

### 3.4.2 Einfluss von Decitabin auf die Expression von CTLA-4

In Voruntersuchungen der Forschungsgruppe konnte in HNSCC-Zelllinien (de Vos et al., 2020) und in Melanom-Zelllinien (Fietz et al., 2021) kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CTLA-4-Proteinexpression und der CTLA4-Promotormethylierung ( $\rho = -0,001$ ,  $p = 0,99$ ,  $N = 113$ ) festgestellt werden (Hoffmann et al., 2023). Ein direkter Einfluss der CTLA4-Methylierung auf die CTLA-4-Proteinexpression kann durch tumorzellintrinsic Prozesse, die den Effekt der Methylierung verbergen könnten, nicht ausgeschlossen werden (Hoffmann et al., 2023). Aus diesem Grund wurde *in vitro* der Einfluss von Decitabin auf die CTLA-4 Expression in HNSCC-Zelllinien untersucht (Hoffmann et al., 2023). Die CTLA4-Methylierung wurde mit der qMSP und die CTLA-4-Expression mittels qRT-PCR, FACS und IHC bestimmt (Hoffmann et al., 2023).

In den unbehandelten Zelllinien, einschließlich der hypomethylierten Zelllinien SCC-25 und Detroit 562, wurde nur eine basale bis fehlende CTLA-4-Expression nachgewiesen

**(Abb. 8C)**(Hoffmann et al., 2023). In allen fünf untersuchten HNSCC-Zelllinien wurde durch die Behandlung mit Decitabin eine Abnahme der Methylierung und ein Anstieg der *CTLA4*-mRNA und CTLA-4-Proteinexpression festgestellt **(Abb. 8A-C)** (Hoffmann et al., 2023). Die FACS-Analyse und immunhistochemische Untersuchung, mit morphologisch sichtbarer Vergrößerung der Zellen und Nucleolen, manifestieren den untersuchten Einfluss von Decitabin auf die Expression von CTLA-4 *in vitro* **(Abb. 8D-E)** (Hoffmann et al., 2023).



**Abb. 8 Pharmakologische Demethylierung reduziert die *CTLA4*-Methylierung und stimuliert die *CTLA4*-Expression in HNSCC-Zelllinien.**

**A:** *CTLA4*-mRNA-Expression ( $\Delta$ CT-Werte) in Decitabin-behandelten (+D) und unbehandelten (-D) HNSCC-Zelllinien sowie einem Pool aus sechs Tonsillen (T; arithmetisches Mittel der Expression aus sechs Proben) **B:** Vergleich der *CTLA4*-Expression: MFI von Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten (+D) Zelllinien. **C:** *CTLA4*-Methylierung (QMS) von Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten HNSCC-Zelllinien (-D). **D:** Histogramme zeigen die Induktion der *CTLA4*-Proteinexpression in Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten (-D) HNSCC-Zelllinien. **E:** IHC zeigt die Induktion der *CTLA4*-Proteinexpression in Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten (-D) HNSCC-Zelllinien. P-Werte beziehen sich jeweils auf Kruskal-Wallis und t-Tests. **Abb. 8** ist in modifizierter Form der Publikation von (Hoffmann et al., 2023) entnommen.

**3.5 Analyse der DNA-Methylierung der Gene *PD-L1*, *LAG3* und *BTLA* bei HNSCC-Patienten**

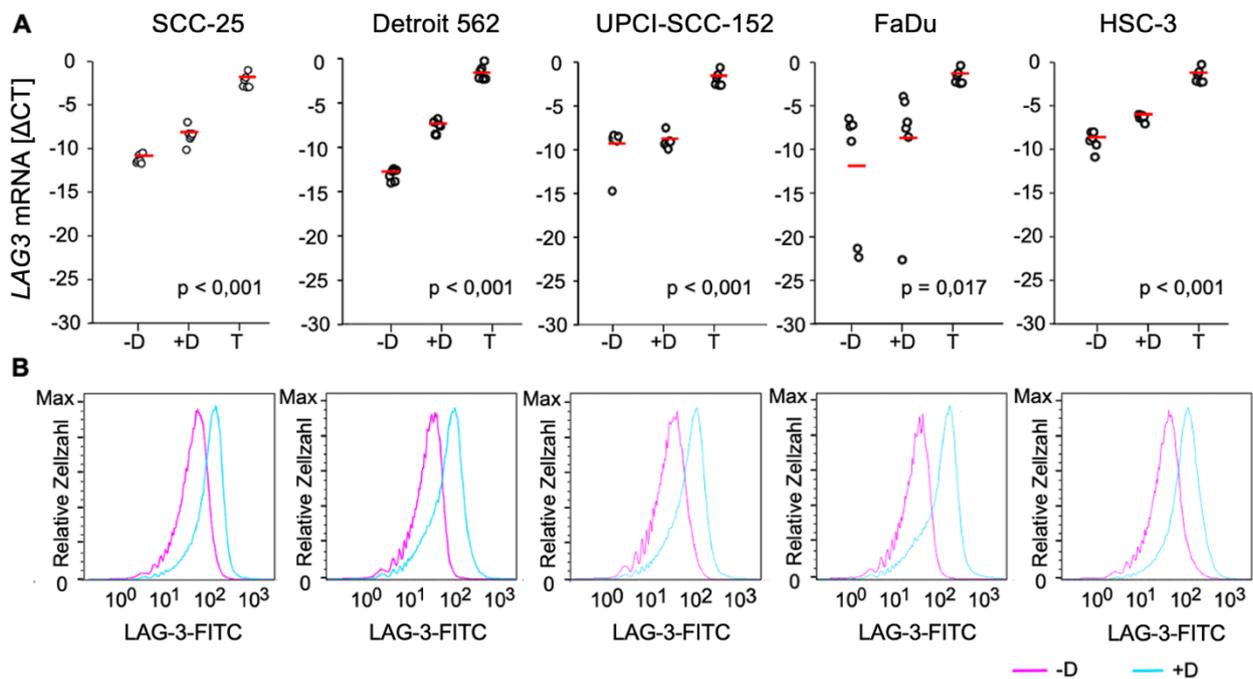
Zusammen mit der TCGA-Kohorte haben wir in dem ICB-Patientenkollektiv (**Tab. 17**) die Signifikanz der DNA-Methylierung der Gene *PD-L1*, *LAG3* und *BTLA* für das PFS und OS untersucht. In der Cox-Regressionsanalyse zeigte sich für die *LAG3*-Methylierung im ICB-Patientenkollektiv kein signifikanter Zusammenhang mit PFS (HR= 1,04 95 %-KI: 0,91–1,19; p= 0,59) oder OS (HR= 0,98 95 %-KI: 0,87–1,11; p= 0,78). Das analysierte CpG-Dinukleotid wurde aufgrund seiner Relevanz in der TCGA-Kohorte ausgewählt: Dort zeigte diese Stelle die stärkste inverse Korrelation mit der *LAG3*-mRNA-Expression ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,001$ ) sowie immunologischen Signaturen wie CD8A<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration ( $r = -0,43$ ;  $p < 0,001$ ) und IFN- $\gamma$ -Signatur ( $r = -0,38$ ;  $p < 0,001$ ).

Ebenso konnte für die Methylierung von *BTLA* keine statistische Assoziation mit PFS (HR= 1,00; 95 %-KI: 0,98–1,02; p= 0,98) oder OS (HR= 0,990; 95 %-KI: 0,97–1,01; p= 0,31) festgestellt werden. Auch für *PD-L1* zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem PFS (HR= 1,02; 95 %-KI: 0,99–1,06; p= 0,17) oder OS (HR= 1,01; 95 %-KI: 0,97–1,04; p= 0,72).

Zusammenfassend zeigte die DNA-Methylierung der Gene *PD-L1*, *LAG3* und *BTLA* in unserer Kohorte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem PFS oder OS.

### 3.6 Einfluss von Decitabin auf die Expression von LAG-3

In **Abb. 9** ist der Einfluss von Decitabin auf die Expression von LAG-3 in HNSCC-Zelllinien mittels qRT-PCR und FACS in fünf Zelllinien dargestellt. In den Zelllinien SCC-25, Detroit 562 und HSC-3 zeigte sich durch die Behandlung mit Decitabin ein Anstieg der LAG3-mRNA-Expression und oberflächlichen Expression von LAG-3. Die Quantifizierung der totalen mRNA wurde mittels fünf Haushaltsgenen (*ACTB*, *ALAS1*, *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*) bestimmt.



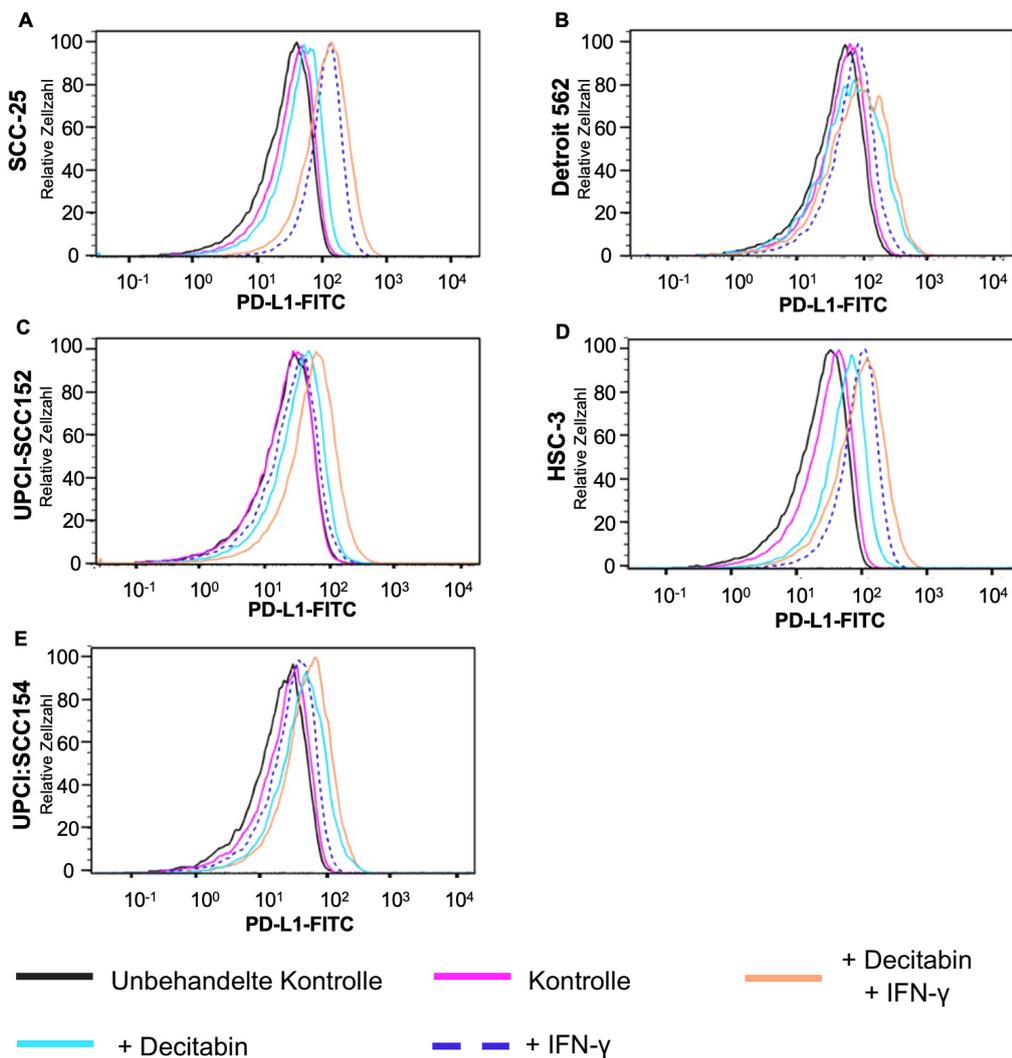
**Abb. 9** Pharmakologische Demethylierung stimuliert die mRNA-Expression und oberflächliche Expression von LAG-3 in HNSCC-Zelllinien.

**A:** LAG3-mRNA-Expression ( $\Delta$ CT-Werte) in Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten (-D) HNSCC-Zelllinien sowie einem Pool aus sechs Tonsillen (T; arithmetisches Mittel der Expression aus sechs Proben)

**B:** Histogramme zeigen die oberflächliche Proteinexpression von LAG-3 in Decitabin-behandelten (+D) im Vergleich zu unbehandelten (-D) HNSCC-Zelllinien. P-Werte beziehen sich auf Kruskal-Wallis und t-Tests.

### 3.7 PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien

Im folgendem bildlich dargestellten Versuch wurde der Einfluss von Decitabin auf die Expression von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien untersucht. Eine Rechtsverschiebung des Peaks korreliert mit einer erhöhten oberflächlichen Expression. Alle untersuchten Zelllinien, die mit Decitabin und IFN- $\gamma$  behandelt wurden, weisen die höchste Expression von PD-L1 auf (**Abb. 10**).

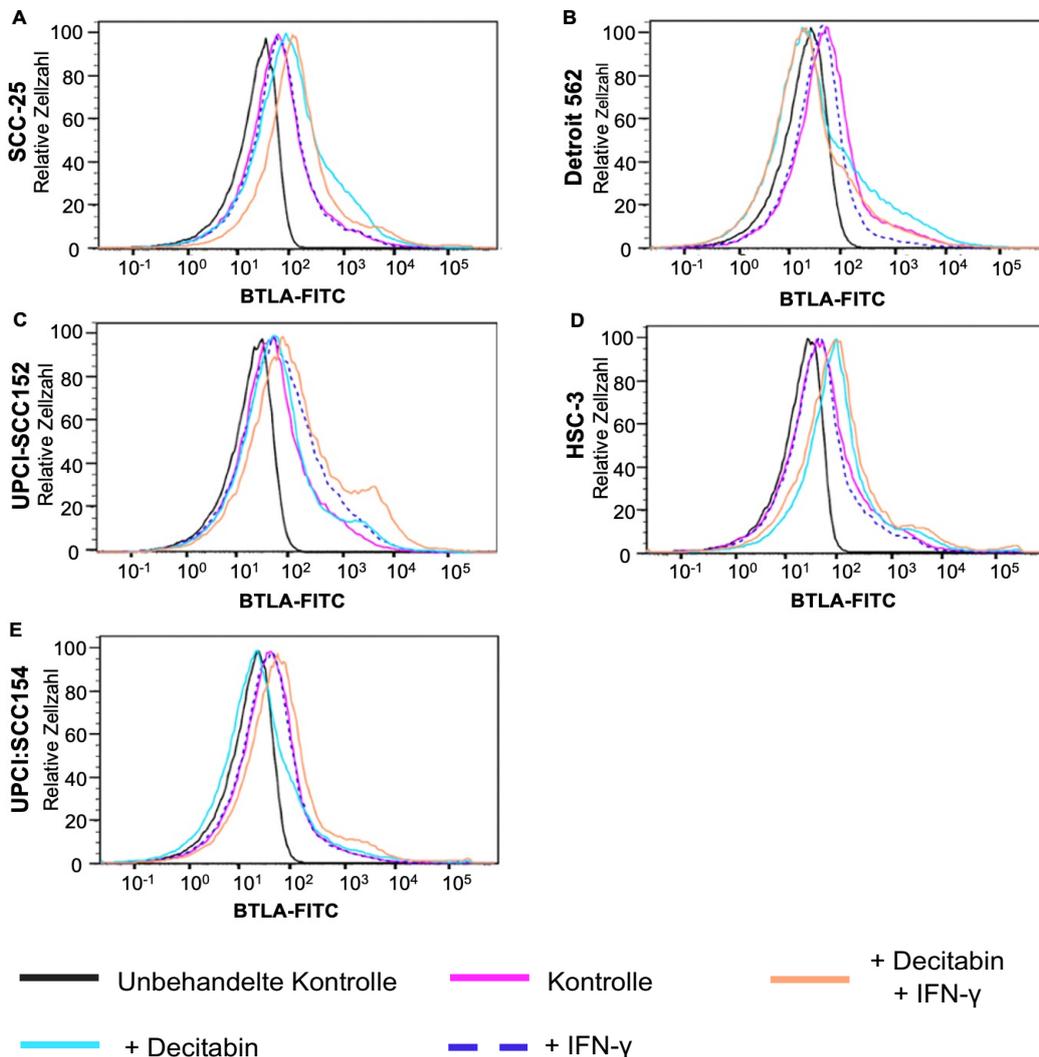


**Abb. 10** Pharmakologische Demethylierung steigert die PD-L1-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$  Induzierbarkeit in HNSCC-Zelllinien.

Histogramme der PD-L1-Expression in HNSCC-Zelllinien vor und nach pharmakologischer Demethylierung sowie mit und ohne IFN- $\gamma$ -Stimulation (**A**: SCC-25, **B**: Detroit 562, **C**: UPCI-SCC152, **D**: HSC-3, **E**: UPCI:SCC154).

### 3.8 BTLA-Expression in HNSCC-Zelllinien

In den HNSCC-Zelllinien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Decitabin und der oberflächlichen Ausbildung von BTLA. Die untersuchten Zelllinien, bis auf Detroit 562, exprimierten BTLA oberflächlich stärker unter dem Einfluss von Decitabin und IFN- $\gamma$  (**Abb. 11**). Die Zelllinie Detroit 562 zeigte ein entgegengesetztes Verhalten im Sinne einer Abnahme der oberflächlichen BTLA-Expression nach Behandlung (**Abb. 11**).



**Abb. 11** Pharmakologische Demethylierung steigert die BTLA-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$  Induzierbarkeit in HNSCC-Zelllinien.

Histogramme der BTLA-Expression in HNSCC-Zelllinien vor und nach pharmakologischer Demethylierung sowie mit und ohne IFN- $\gamma$ -Stimulation (**A**: SCC-25; **B**: Detroit 562; **C**: UPCI-SCC152; **D**: HSC-3; **E**: UPCI:SCC154).

## 4. Diskussion

Ein Hauptziel der modernen Onkologie ist eine individuelle, patientenzentrierte Therapie, die spezifisch der Tumorbiologie angepasst ist (Casolino et al., 2023; Wahida et al., 2023). Biomarker, welche zuverlässig das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen, sind für das Erreichen dieses Ziels von besonderer Bedeutung (Casolino et al., 2023; Wahida et al., 2023). Ziel dieser Arbeit war, die Analyse des Einflusses der DNA-Methylierung auf die Expression der Immuncheckpoint-Gene *PD-L1*, *CTLA4*, *LAG3* und *BTLA* in HNSCC und UC zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass im mUC die Methylierung von *PD-L1* bei Patienten unter ICB-Behandlung mit dem klinischen Ansprechen und dem OS korreliert (Klümper et al., 2023). Patienten mit der niedrigsten *PD-L1*-Methylierung zeigten ein längeres OS unter ICB-Behandlung (Klümper et al., 2023). Während unsere Studie die klinische Relevanz von *PD-L1*-Promotor-Methylierung als potenziellen prädiktiven Biomarker hervorhebt, entwickelt sich das Feld der Immuncheckpoint-Inhibition rasch weiter. In diesem Zusammenhang zeigt beispielsweise eine Subgruppenanalyse von Li et al. (2023), dass eine hohe LAG-3-Expression bei Patienten mit UC mit einem schlechteren PFS assoziiert war. Klinische Studien deuten darauf hin, dass eine erhöhte BTLA-Expression in verschiedenen Tumorarten häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Andrzejczak und Karabon, 2024). Die prädiktive Relevanz von CTLA-4 im UC wird in der aktuellen Forschung kontrovers diskutiert. Einerseits deuten präklinische Studien darauf hin, dass eine Blockade von CTLA-4 das Immunsystem aktivieren und das Tumorwachstum bei UC hemmen könnte (Zhang et al., 2019). Andererseits gibt es bisher keinen zugelassenen CTLA-4-Inhibitor speziell für die Behandlung des mUC (Ogbuji et al., 2023). Obwohl diese alternativen Checkpoints bei der Behandlung des mUC vielversprechend sein könnten, bleiben PD-1 / PD-L1-Inhibitoren aufgrund ihrer etablierten Wirksamkeit und ihres Sicherheitsprofils vorerst die primäre und am häufigsten eingesetzte Option in der Immuntherapie des mUC (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Die Mehrheit der Patienten unserer Kohorten erhielt keine spezifischen CTLA-4- oder LAG-3-Inhibitoren; dennoch analysierten wir diese Checkpoints, da sie über

synergistische Signalwege mit PD-1 interagieren (Arasanz et al., 2017; Huang et al., 2017). Die Analyse der Hypomethylierung dieser Checkpoints spiegelt ein immunaktives Tumormikromilieu wider, das unabhängig vom spezifisch eingesetzten Checkpoint-Inhibitor das Ansprechen auf Immuntherapien vorhersagen kann (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2021).

In anderen Tumorentitäten wie HNSCC rücken neue Ansätze in den Fokus, darunter die Bedeutung der *CTLA4*-Methylierung als potenzieller prädiktiver Biomarker.

Wir haben festgestellt, dass eine niedrigere *CTLA4*-Promotor-Methylierung mit einem besseren Ansprechen auf ICB und einem verlängerten PFS korreliert (Hoffmann et al., 2023). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien zur *CTLA4*-Methylierung in Melanomen (Goltz et al., 2018) und Nierenzellkarzinomen (Klümper et al., 2021), was auf eine mögliche tumorübergreifende Bedeutung dieses Biomarkers hindeutet (Hoffmann et al., 2023).

Unsere Studie zeigt auch Grenzbereiche auf, die weiteren Untersuchungen bedürfen. Für Patienten mit hypomethyliertem HNSCC zeigte sich für das OS ein Trend zu einem besseren Verlauf (Hoffmann et al., 2023). Mögliche Gründe für das statistisch nicht-signifikante Ergebnis beim OS sind die kleine Stichprobengröße von 29 Patienten, der möglicherweise zu kurze Nachbeobachtungszeitraum für OS-Analysen und der Einfluss von Folgetherapien nach Tumorprogression (Hoffmann et al., 2023). Zudem könnte die Heterogenität der Patientenkohorte bezüglich HNSCC-Lokalisationen und Vorbehandlungen eine Rolle spielen (Hoffmann et al., 2023). Die vielschichtige Natur der Tumorbilogie legt nahe, dass die *CTLA4*-Methylierung als einzelner Parameter nicht ausreichend ist, um das OS präzise vorherzusagen (Hoffmann et al., 2023). Die *CTLA4*-Methylierung ist ein besserer Prädiktor für das PFS als für das OS (Hoffmann et al., 2023). Die Komplexität dieser Faktoren zeigt die Schwierigkeiten das OS von HNSCC-Patienten unter Immuntherapie anhand einzelner Biomarker wie der *CTLA4*-Methylierung vorherzusagen (Hoffmann et al., 2023). Eine Limitierung unserer Studie besteht darin, dass keine Patienten untersucht wurden, die mit spezifischen Anti-LAG3- oder Anti-BTLA-

Inhibitoren behandelt wurden. Zukünftige Studien sollten solche Patientenkohorten einbeziehen, um die prädiktive Relevanz dieser Checkpoints unter gezielter Therapie genauer zu bewerten.

Darüber hinaus zeigte eine klinische Untersuchung, dass eine niedrigere CTLA4-Methylierung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für immunvermittelte Nebenwirkungen assoziiert ist, die gleichzeitig mit einem besseren Therapieansprechen und einem verlängerten PFS einhergehen (Foster et al., 2021; Hoffmann et al., 2023). Dies verdeutlicht die komplexe Beziehung zwischen Immunaktivierung, therapeutischer Wirksamkeit und Nebenwirkungen bei Immuntherapien.

Neben der bereits beschriebenen Bedeutung der *PD-L1*-Methylierung hat die pharmakologische Demethylierung durch Decitabin *in vitro* zu einer verstärkten Expression von CTLA-4, LAG-3 und BTLA geführt. Diese Effekte wurden in mehreren HNSCC- und UC-Zelllinien beobachtet. Besonders deutlich war die Verstärkung der Expression nach kombinierter Behandlung mit Decitabin und IFN- $\gamma$ , was auf eine Interaktion zwischen epigenetischen Mechanismen und zytokinvermittelten Signalwegen hinweist (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023).

Die Ergebnisse zur Demethylierung zeigen eine signifikante Abnahme der Methylierung und eine vermehrte mRNA- sowie Proteinexpression bei CTLA-4 (Hoffmann et al., 2023) und LAG-3. Für BTLA konnte ebenfalls eine erhöhte Expression nach Decitabin-Behandlung festgestellt werden, was auf eine tumorzellintrinsische Bedeutung dieser epigenetischen Modulation hinweist. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die epigenetische Regulation von Immuncheckpoint-Genen durch DNA-Methylierung im UC und HNSCC nicht nur funktionelle Biomarker darstellen könnten, sondern auch als Ansatz zur Verbesserung der Effektivität von Immuntherapien dienen könnten (de Vos et al., 2020; Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). Zusätzlich führte die Decitabin-Behandlung zu morphologischen Veränderungen, einschließlich einer deutlichen Zellvergrößerung, was auf komplexe zelluläre Antworten wie Seneszenz hinweisen könnte (Hoffmann et al.,

2023; Putri et al., 2017). Ein weiterer möglicher Mechanismus, der die zellulären Reaktionen auf die Decitabin-Behandlung erklärt, ist die Aktivierung endogener retroviraler Elemente. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie Decitabin können durch globale Demethylierung zuvor stille endogene retroviraler Elemente reaktivieren, was zur Produktion von doppelsträngiger RNA führt und eine Interferon-Antwort auslöst (Chiappinelli et al., 2015). Diese immunstimulierende Wirkung könnte ebenfalls zu den beobachteten morphologischen Veränderungen beitragen.

Zukünftig müssen weitere Faktoren aufgrund der Komplexität der Genexpression, wie beispielsweise die Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, sowie die Funktion der Demethylierung auf die Aktivität von Enhancern berücksichtigt werden (Hosokawa und Rothenberg, 2018; Lee et al., 2009; Plank und Dean, 2014). Neben der DNA-Methylierung spielen Histonmodifikationen eine entscheidende Rolle bei der epigenetischen Regulation der Genexpression (Moore et al., 2013).

Die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Aktivierung bewirkt neben der Transkriptionsaktivierung auch Veränderungen der Chromatinstruktur, wodurch die Zugänglichkeit des CTLA4-Promotors für Transkriptionsfaktoren erhöht wird (Mo et al., 2018).

Eine wichtige Frage, die sich aus unseren Untersuchungen ergibt, ist die der zelltypspezifischen Methylierung. In Tumorgewebe findet sich ein komplexes Gemisch aus Tumorzellen, Stromazellen und infiltrierenden Immunzellen (Loyfer et al., 2023). Die gemessenen Methylierungswerte stellen daher einen Durchschnitt über alle diese Zelltypen dar. Es ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche Methylierungsmuster aufweisen können (Loyfer et al., 2023). Insbesondere Immunzellen zeigen oft charakteristische Methylierungsprofile die mit ihrem Aktivierungszustand und ihrer Funktion zusammenhängen (Loyfer et al., 2023). Um diese Frage genauer zu untersuchen, wären Einzelzellanalysen oder die Untersuchung von isolierten Zellpopulationen hilfreich.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Analyse von zirkulierender Tumor-DNA (englisch „circulating tumor DNA“, ctDNA) wie in der Übersichtsarbeit von Nikanjam et al.

(2022) beschrieben. Diese Arbeit fasst zusammen, dass ctDNA-Muster genutzt werden können, um frühe und dynamische Bewertungen des Ansprechens auf Immuntherapien zu ermöglichen. Darüber hinaus wird dargestellt, dass die Analyse von Methylierungsmustern in ctDNA prädiktive Informationen über das Therapieansprechen liefern kann (Nikanjam et al., 2022). Ein wichtiger Aspekt, der in unserer Studie nicht direkt evaluiert wurde, ist der Einfluss von Genamplifikationen und -deletionen auf die *PD-L1*-Expression und -Methylierung. Es ist bekannt, dass Kopienzahlvariationen des *PD-L1*-Gens in verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des UC, auftreten können (Huang et al., 2021). Solche genetischen Veränderungen können die Expression von PD-L1 beeinflussen und möglicherweise auch Auswirkungen auf den Methylierungsstatus haben (Cha et al., 2019). Unser Methylierungsassay, das auf qMSP basiert und ACTB als Referenzgen verwendet, berücksichtigt indirekt auch Genamplifikationen. Dieser Effekt ergibt sich aus der Quantifizierung des Verhältnisses zwischen methylierten Kopien des Zielgens und der Gesamtmenge des Referenzgens. Diese Methodik ermöglicht eine präzise Bestimmung des Methylierungsgrades des Zielgens relativ zur Expression eines standardisierten Referenzgens.

Nicht-kodierende RNAs wie MicroRNAs oder lange nicht-kodierende RNAs (englisch „long non-coding RNAs“, lncRNAs) sind häufig in Tumoren dysreguliert und können durch DNA-Methylierung reguliert werden (Toden et al., 2021; Zhao et al., 2022). Beispielsweise wurde gezeigt, dass lncRNAs wie MALAT1 mit Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert sind (Bai et al., 2023). Diese nicht-kodierenden RNAs könnten potenziell als prädiktive Biomarker dienen, wobei weitere Forschung zur Kombination mit Methylierungsanalysen erforderlich sind. PCR-basierte Verfahren, obwohl als leistungsfähige Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen anerkannt, unterliegen mehreren methodischen Einschränkungen. Die Spezifität der Amplifikation kann durch unbeabsichtigte Vervielfältigung nicht-targetspezifischer DNA-Abschnitte beeinträchtigt werden, wodurch die Präzision der Ergebnisse verfälscht werden kann

(Nygaard et al., 2005). Die hohe Sensitivität macht die Methoden zudem anfällig für Kontaminationen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Borst et al., 2004). Parallel dazu haben irreversible Deletionen schwerwiegende Konsequenzen – sie löschen genetische Information dauerhaft, stören zelluläre Funktionen und erschweren die Interpretation phänotypischer Effekte (Pertesi et al., 2019). In diesem Zusammenhang messen Assays mit zwei separaten Sonden, für methylierte und unmethylierte Sequenzen, den prozentualen Anteil der Methylierung. Diese Methode ermöglicht eine präzise Erfassung der DNA-Methylierung, berücksichtigt jedoch Veränderungen der Genkopienzahl wie Amplifikationen oder Deletionen nicht direkt, wodurch die Interpretation der Ergebnisse beeinflusst werden kann (Ma et al., 2013; Capper et al., 2018).

Aufbauend darauf wurde in dieser Arbeit die Auswahl der analysierten CpG-Stellen gezielt auf Basis ihrer bekannten prädiktiven Relevanz in anderen Tumorentitäten getroffen (Fietz et al., 2021; Goltz et al., 2018; Klümper et al., 2021). Insbesondere wurden CpG-Stellen untersucht, die in früheren Studien bei Melanomen und Nierenzellkarzinomen als prädiktiv für das Ansprechen auf Immuntherapien identifiziert wurden (Fietz et al., 2021; Goltz et al., 2018; Klümper et al., 2021). Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die Analyse auf potenziell funktionell relevante Regionen zu fokussieren. Ein methodischer Aspekt, der diskutiert werden muss, ist die Einschränkung, dass nur einzelne oder wenige CpG-Stellen innerhalb der regulatorischen Regionen der Gene analysiert wurden. Diese gezielte Auswahl bietet zwar den Vorteil einer hohen Spezifität und Relevanz für die untersuchten Fragestellungen, erfasst jedoch nicht die gesamte Methylierungslandschaft eines Gens. Die Konzentration auf spezifische CpG-Stellen in regulatorischen Regionen könnte zudem eine Vereinfachung der komplexen Mechanismen epigenetischer Regulation bewirken. Dies unterstreicht, dass die Analyse isolierter CpGs trotz funktioneller Vorselektion keine ausreichende Prädiktion ermöglichen könnte. Um ein vollständigeres Bild zu erhalten, könnten alternative Methoden wie die Bisulfid-

Sequenzierung eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht die Analyse aller CpGs innerhalb eines bestimmten Genlokus und liefert eine umfassendere Übersicht über die epigenetische Regulation (Li und Tollefsbol, 2011). Aufgrund der hohen Anzahl an CpGs erfordert diese Methode aber auch eine größere Menge an Probenmaterial und ist methodisch sowie ressourcenmäßig anspruchsvoller. Für zukünftige Studien wäre es sinnvoll, zusätzlich zur Methylierungsanalyse auch Kopienzahlvariationen zu untersuchen, um ein vollständigeres Bild der Regulationsmechanismen zu erhalten. Dies könnte durch Methoden wie qPCR oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgen.

Die Frage nach der potenziellen Rolle der Deglykosylierung eröffnet interessante Perspektiven für die Verbesserung der prädiktiven Biomarker in der Immuntherapie. Eine enzymatische Deglykosylierung von beispielsweise PD-L1 vor einer IHC könnte möglicherweise zu einer präziseren Erfassung der tatsächlichen PD-L1-Expression auf Tumorzellen führen und somit eine genauere Einschätzung des Immunstatus des Tumors ermöglichen (Lee et al., 2019). Dies könnte insbesondere relevant sein, da die Glykosylierung die immunhistochemische Detektion von Immuncheckpoints beeinträchtigen kann (Lee et al., 2019). Es wäre denkbar, dass die deglykosylierte PD-L1-Expression besser mit dem klinischen Ansprechen auf ICB korreliert (Lee et al., 2019). Die technische Umsetzung einer Deglykosylierung vor der immunhistochemischen Färbung ist allerdings umfangreich und würde eine sorgfältige Standardisierung erfordern, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten (Lee et al., 2019; Wang et al., 2022). Zudem ist die biologische Relevanz der glykosylierten versus deglykosylierten Form von PD-L1 für die Interaktion mit Immunzellen noch nicht vollständig geklärt (Li et al., 2016). Die Studie von Klümper et al. (2023) verdeutlicht die Komplexität der Immunregulation, die über die reine PD-L1-Expression hinausgeht. Die Ergebnisse zeigen, dass die PD-L1-Promotor-Methylierung ein stabilerer und zuverlässigerer prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf Immuntherapien sein könnte als die herkömmliche PD-L1-Expression, die mittels IHC gemessen wird (Klümper et al., 2023). Die Kombination der Analyse der PD-L1-Promotor-Methylierung mit der Deglykosylierung könnte darüber hinaus ein noch

umfassenderes Verständnis der Immuncheckpoint-Regulation und ihrer prädiktiven Bedeutung bei HNSCC und UC ermöglichen. Um den potenziellen klinischen Nutzen einer solchen kombinierten Methode zu validieren, sind jedoch weitere Studien erforderlich.

In Übereinstimmung mit unseren früheren Untersuchungen zu HNSCC und Melanomen, konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen der *CTLA4*-Promotor-Methylierung und der CTLA-4-Proteinexpression nachweisen (de Vos et al., 2020; Fietz et al., 2021). Die exakte immunhistochemische Detektion des CTLA-4-Proteins wird durch mehrere Faktoren erschwert. Dazu gehören Schwankungen in den CTLA-4-Umsatzraten, verschiedene posttranslationale Veränderungen, wie die Glykosylierung, sowie das Vorkommen unterschiedlicher CTLA-4-Isoformen (Valk et al., 2008). Wir stellten fest, dass die DNA-Methylierung von *CTLA4* zuverlässiger und einfacher zu quantifizieren ist als die Proteinexpression, insbesondere in begrenzt verfügbaren FFPE-Gewebeproben (Hoffmann et al., 2023). Dies ist von besonderer Bedeutung für die klinische Anwendung, da FFPE-Proben häufig in der Routinediagnostik verwendet werden (Heydt et al., 2014). Die Entwicklung prädiktiver Biomarker für die Immuntherapie ist ein komplexes Unterfangen, welches die Integration verschiedener molekularer und klinischer Daten erfordert. Die Methylierung von ICB-Genen stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz dar, der jedoch im Kontext anderer Faktoren betrachtet werden muss. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen die dynamischen Veränderungen der Methylierungsmuster während der Tumorprogression und Behandlung zu untersuchen. Insbesondere für BTLA könnten Einzelzellanalysen wertvolle Einblicke liefern, um zelltypspezifische Unterschiede in der Methylierung und Expression zu identifizieren. Darüber hinaus könnten prospektive Studien klären, ob BTLA als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf Immuntherapien genutzt werden kann. Longitudinale Studien mit wiederholter Probengewinnung könnten wertvolle Einblicke in die epigenetische Plastizität von Tumoren liefern und zur Entwicklung adaptiver Therapiestrategien beitragen. Darüber hinaus sollte die Kombination von Methylierungsanalysen mit anderen

Biomarkern und bildgebenden Verfahren angestrebt werden, um ein genaueres Bild der Tumorimmunologie zu erhalten und die Präzisionsmedizin in der Onkologie weiterzuentwickeln.

Um die Ergebnisse systematisch darzustellen, wurden die untersuchten Immuncheckpoints PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und BTLA in Bezug auf ihre epigenetische Regulation und klinische Relevanz in HNSCC und UC verglichen. Während PD-L1 insbesondere im mUC eine zentrale Rolle als prädiktiver Biomarker für das PFS und OS spielt, zeigte sich CTLA-4 vor allem im HNSCC als relevant für das PFS (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). LAG-3 und BTLA hingegen weisen in beiden Tumorentitäten potenzielle prädiktive Eigenschaften auf, wobei ihre genaue klinische Bedeutung noch weiter untersucht werden muss.

Die pharmakologische Demethylierung durch Decitabin führte *in vitro* zu einer verstärkten Expression von CTLA-4, LAG-3 und BTLA, insbesondere in Kombination mit IFN- $\gamma$  (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, epigenetische Modulation gezielt einzusetzen, um die Effektivität von Immuntherapien zu verbessern. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der DNA-Methylierung als stabilen prädiktiven Biomarker und als Ansatz zur Optimierung von Immuntherapien. Sie liefern wichtige Einblicke in die komplexe Immunregulation von Tumoren und eröffnen neue Perspektiven für personalisierte Therapiestrategien bei HNSCC- und mUC-Patienten. Zukünftige Studien sollten sich auf zelltypspezifische Methylierungsanalysen, die Integration weiterer epigenetischer Mechanismen und longitudinale Untersuchungen konzentrieren. Die Kombination von Methylierungsanalysen mit anderen Biomarkern könnte dazu beitragen, personalisierte Therapiestrategien bei HNSCC- und mUC-Patienten weiterzuentwickeln.

## 5. Zusammenfassung

Die fünf Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs („head and neck squamous cell carcinoma“, HNSCC) beträgt weniger als 50 %. Die Mehrzahl der Patienten mit metastasierendem HNSCC profitiert nicht von einer langfristigen Tumorremission unter Immuntherapie. Der Einsatz von Biomarkern, die ein patientenzentriertes Therapieansprechen vorhersagen können, ist ein weiteres diagnostisch wichtiges Verfahren. Für die Entwicklung von mechanistischen Biomarkern ist das Verständnis der Genregulation, insbesondere auf epigenetischer Ebene, wie der DNA-Methylierung, von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit wurde der prädiktive Wert der Genmethylierung der Immuncheckpoints des programmierten Zelltod-Liganden 1 („programmed cell death ligand-1“, PD-L1), des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Proteins 4 („cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4“, CTLA-4), des Lymphozyten-Aktivierungsgens 3 („lymphocyte-activation gene 3“, LAG-3) und des B- und T-Lymphozyten-Attenuators („B- and T-lymphocyte attenuator“, BTLA), deren Relevanz im Tumormikromilieu und die regulatorische Funktion in HNSCC und Urothelkarzinom-Zelllinien („urothelial carcinoma“, UC) untersucht. Im metastasiertem UC konnte nachgewiesen werden, dass eine niedrige *PD-L1*-Methylierung mit einem besseren Ansprechen auf die Immuncheckpoint-Blockade („immune checkpoint blockade“, ICB) korreliert und Patienten ein verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben aufweisen.

Die daraus gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen der Hypomethylierung des *PD-L1*-Promotors und dem erhöhten Effekt der Interferon-gamma Induzierbarkeit im UC.

In HNSCC konnten wir feststellen, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CTLA-4-Expression und dem Therapieansprechen in Bezug auf das progressionsfreie Überleben unter einer gegen das programmierte Zelltod-Protein 1 („programmed cell death protein-1“, PD-1) gerichteten Therapie gibt. Die durchgeführten Behandlungen mit

Decitabin haben in vitro zu einer fallenden Methylierung und einem Anstieg der *CTLA4*-mRNA und CTLA-4-Proteinexpression geführt und lassen darauf schließen, dass unter anderem die Methylierung des *CTLA4*-Promotors eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation der CTLA-4-Expression einnimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte in Zukunft die *CTLA4*-DNA-Hypomethylierung als prognostischer prädiktiver Biomarker dienen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl UC als auch HNSCC im erheblichen Maße Immuncheckpoints exprimieren, welche in vitro mittels Genmethylierung beeinflusst werden können. Der in dieser Arbeit festgestellte Einfluss der Methylierung auf die Expression der Immuncheckpoints in UC und HNSCC-Zelllinien lässt eine tumorzellintrinsische Bedeutung für das Ansprechen auf die ICB-Behandlung vermuten. Besonders der prädiktive Wert der *CTLA4*-DNA-Methylierung sollte in klinischen Studien der anti-PD-1- und / oder anti-CTLA-4-Immuntherapie in HNSCC weiter erforscht werden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsmechanismus von der PD-L1/ PD-1-Immuncheckpoint-Achse	15
Abbildung 2: Exemplarischer Versuchsaufbau der Behandlung von HNSCC-Zelllinien mit Decitabin	23
Abbildung 3: Exemplarischer Versuchsaufbau der Behandlung von UC-Zelllinien mit Decitabin	24
Abbildung 4: Immuntherapeutisches Ansprechen und Überleben in Abhängigkeit vom <i>PD-L1</i> -Methylierungsstatus im mUC	42
Abbildung 5: Pharmakologische Demethylierung steigert die PD-L1-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$ -Induzierbarkeit in UC-Zelllinien	43
Abbildung 6: Pharmakologische Demethylierung steigert die BTLA-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$ Induzierbarkeit in UC-Zelllinien	45
Abbildung 7: Zusammenhang zwischen der <i>CTLA4</i> -DNA-Methylierung und dem Therapieansprechen, PFS und OS von HNSCC-Patienten unter ICB-Behandlung	47
Abbildung 8: Pharmakologische Demethylierung reduziert die <i>CTLA4</i> -Methylierung und stimuliert die CTLA-4-Expression in HNSCC-Zelllinien	49
Abbildung 9: Pharmakologische Demethylierung stimuliert die mRNA-Expression und oberflächliche Expression von LAG-3 in HNSCC-Zelllinien	51
Abbildung 10: Pharmakologische Demethylierung steigert die PD-L1-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$ Induzierbarkeit in HNSCC-Zelllinien	52
Abbildung 11: Pharmakologische Demethylierung steigert die BTLA-Expression und erhöht die IFN- $\gamma$ Induzierbarkeit in HNSCC-Zelllinien	53

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Weltweite Anzahl und Mortalität von HNSCC pro Jahr	9
Tabelle 2:	Komponente für die Hauptexperimente	19
Tabelle 3:	Geräte zur Durchführung der Experimente	20
Tabelle 4:	Medium für HNSCC und Zelllinien aus dem UC	22
Tabelle 5:	Übersicht Gelelektrophorese	26
Tabelle 6:	Programm für die Umschreibung von RNA in cDNA	27
Tabelle 7:	qRT-PCR Master Mix Zusammensetzung (5 µl)	28
Tabelle 8:	qRT-PCR Reaktionsmix Zusammensetzung (20 µl)	28
Tabelle 9:	Thermocycler Programm für die qRT-PCR	29
Tabelle 10:	Spezifische Primer der qRT-PCR mit individuellen Temperaturen	30
Tabelle 11:	Komponente und Hersteller für die Bisulfitierung und Aufreinigung	32
Tabelle 12:	Primer und Proben für die qMSP von LAG3	33
Tabelle 13:	qMSP-Komponenten (20 µl)	33
Tabelle 14:	Thermocycler-Programm für die qMSP von LAG3	33
Tabelle 15:	Primer und Sonden für die qMSP von CTLA4 und ACTB	34
Tabelle 16:	Thermocycler-Programm für die qMSP von CTLA4	34
Tabelle 17:	Spezifische Übersicht UKB HNSCC Nicht-ICB / ICB-Patientenkollektiv (UKB Nicht-ICB / ICB Patienten)	36
Tabelle 18:	Spezifische Übersicht der mUC-Patienten	38

## 8. Literaturverzeichnis

Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001: 220–228

Andrzejczak A, Karabon L. BTLA biology in cancer: from bench discoveries to clinical potentials. *Biomark Res.* 2024: 8

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010: 24–35

Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, Escors D. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget.* 2017: 51936–51945

Bai S, Guo J, Zhang H. A meta-analysis of the clinicopathological significance of the lncRNA MALAT1 in human gastric cancer. *Front Oncol.* 2023: 1257120

Baixeras E, Huard B, Miossec C, Jitsukawa S, Martin M, Hercend T, Auffray C, Triebel F, Piatier-Tonneau D. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J Exp Med.* 1992: 327–337

Bao Y, Zhang D, Guo H, Ma W. Beyond blood: Advancing the frontiers of liquid biopsy in oncology and personalized medicine. *Cancer Sci.* 2024; 115: 1060–1072

Benicky J, Sanda M, Brnakova Kennedy Z, Grant OC, Woods RJ, Zwart A, Goldman R. PD-L1 Glycosylation and Its Impact on Binding to Clinical Antibodies. *J Proteome Res.* 2021: 485–497

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69: 89–95

Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004: 289–299

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48: 3282–3287

Brown R, Plumb JA. Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy. *Expert*

Rev Anticancer Ther. 2004; 4: 501–510

Bryan J, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Jabbour E. Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011; 661–672

Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, u. a. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol*. 2018; 136: 181–210

Carlomagno N, Incollingo P, Tammaro V, Peluso G, Rupealta N, Chiacchio G, Sandoval Sotelo ML, Minieri G, Pisani A, Riccio E, Sabbatini M, Bracale UM, Calogero A, Dodaro CA, Santangelo M. Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 7869802

Casolino R, Johns AL, Courtot M, Lawlor RT, De Lorenzo F, Horgan D, Mateo J, Normanno N, Rubin M, Stein L, Subbiah V, Westphalen BC, Lawler M, Park K, Perdomo S, Yoshino T, Wu J, Biankin AV. Accelerating cancer omics and precision oncology in health care and research: a Lancet Oncology Commission. *Lancet Oncol*. 2023: 123–125

Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*. 2013: 556–563

Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell*. 2019: 359–370

Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, Hein A, Rote NS, Cope LM, Snyder A, Makarov V, Budhu S, Slamon DJ, Wolchok JD, Pardoll DM, Beckmann MW, Zahnow CA, Merghoub T, Chan TA, Baylin SB, Strick R. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015: 974–986

Chocarro L, Blanco E, Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Fernández-Rubio L, Morente P, Fernández-Hinojal G, Echaide M, Garnica M, Ramos P, Vera R, Kochan G, Escors D. Understanding LAG-3 Signaling. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 5282

Claus R, Almstedt M, Lübbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol*. 2005: 511–520

Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A „quickscore“ method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995: 876–878

de Vos L, Carrillo Cano TM, Zarbl R, Klümper N, Ralser DJ, Franzen A, Herr E, Gabrielpillai J, Vogt TJ, Dietrich J, Strieth S, Landsberg J, Dietrich D. CTLA4 , PD-1 , PD-L1 , PD-L2 , TIM-3 , TIGIT , and LAG3 DNA Methylation Is Associated With BAP1 - Aberrancy, Transcriptional Activity, and Overall Survival in Uveal Melanoma. *J Immunother.* 2022: 324–334

de Vos L, Grünwald I, Bawden EG, Dietrich J, Scheckenbach K, Wiek C, Zarbl R, Bootz F, Landsberg J, Dietrich D. The landscape of. *Epigenetics.* 2020: 1195–1212

Dietrich D, Meller S, Uhl B, Ralla B, Stephan C, Jung K, Ellinger J, Kristiansen G. The landscape of CD28, CD80, CD86, CTLA4, and ICOS DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas *Epigenetics.* 2020: 1195–1212

Dietrich D, Meller S, Uhl B, Ralla B, Stephan C, Jung K, Ellinger J, Kristiansen G. Nucleic acid-based tissue biomarkers of urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014; 51: 173–199

Eckstein M, Erben P, Kriegmair MC, Worst TS, Weiß CA, Wirtz RM, Wach S, Stoehr R, Sikic D, Geppert CI, Weyerer V, Bertz S, Breyer J, Otto W, Keck B, Burger M, Taubert H, Weichert W, Wullich B, Bolenz C, Hartmann A, Erlmeier F. Performance of the Food and Drug Administration/EMA-approved programmed cell death ligand-1 assays in urothelial carcinoma with emphasis on therapy stratification for first-line use of atezolizumab and pembrolizumab. *Eur J Cancer.* 2019: 234–243

Eckstein M, Gupta S. New insights in predictive determinants of the tumor immune microenvironment for immune checkpoint inhibition: a never ending story? *Ann Transl Med.* 2019: S135

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148–1159

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021;

Fietz S, Zarbl R, Niebel D, Posch C, Brossart P, Gielen GH, Strieth S, Pietsch T, Kristiansen G, Bootz F, Landsberg J, Dietrich D. CTLA4 promoter methylation predicts response and progression-free survival in stage IV melanoma treated with anti-CTLA-4 immunotherapy (ipilimumab). *Cancer Immunol Immunother.* 2021: 1781–1788

Fröhlich A, Sirokay J, Fietz S, Vogt TJ, Dietrich J, Zarbl R, u. a. Molecular, clinicopathological, and immune correlates of LAG3 promoter DNA methylation in melanoma. *EBioMedicine.* 2020; 59: 102962

Foster CC, Couey MA, Kochanny SE, Khattri A, Acharya RK, Tan Y-HC, Brisson RJ, Leidner RS, Seiwert TY. Immune-related adverse events are associated with improved response, progression-free survival, and overall survival for patients with head and neck cancer receiving immune checkpoint inhibitors. *Cancer*. 2021; 127: 4565–4573

Franzen A, Vogt TJ, Müller T, Dietrich J, Schröck A, Golletz C, Brossart P, Bootz F, Landsberg J, Kristiansen G, Dietrich D. PD-L1 (CD274) and PD-L2 (PDCD1LG2) promoter methylation is associated with HPV infection and transcriptional repression in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2018: 641–650

Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011: 737–745

Gawrych KG, Pesch, Rabstein, Weiss, Casjens, Rihs, Angerer, Bueno-de-Mesquita, Ros, Kaaks, Chang-Claude, Tjønneland, Brüning, Vineis. 62 Occupational exposure to aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons and bladder cancer: Results from the EPIC cohort. *Occup Environ Med*. 2013; 70: A21

Gevensleben H, Holmes EE, Goltz D, Dietrich J, Sailer V, Ellinger J, Dietrich D, Kristiansen G. PD-L1 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *Oncotarget*. 2016: 79943–79955

Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016: e542–e551

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015: 3235–3242

Gillison ML, Restighini C. Anticipation of the Impact of Human Papillomavirus on Clinical Decision Making for the Head and Neck Cancer Patient. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015: 1045–1060

Goltz D, Gevensleben H, Dietrich J, Dietrich D. PD-L1 (CD274) promoter methylation predicts survival in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology*. 2017a: e1257454

Goltz D, Gevensleben H, Grünen S, Dietrich J, Kristiansen G, Landsberg J, Dietrich D. PD-L1 (CD274) promoter methylation predicts survival in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017b: 738–743

Goltz D, Gevensleben H, Vogt TJ, Dietrich J, Golletz C, Bootz F, Kristiansen G, Landsberg J, Dietrich D. CTLA4 methylation predicts response to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immunotherapy in melanoma patients. *JCI Insight*. 2018; 3: e96793, 96793

Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor DR, Salama AK, Taylor MH, Ott PA, Horak C, Gagnier P, Jiang J, Wolchok JD, Postow MA. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016: 1558–1568

Hoffmann F, Franzen A, de Vos L, Wuest L, Kulcsár Z, Fietz S, Maas AP, Hollick S, Diop MY, Gabrielpillai J, Vogt T, Kuster P, Zarbl R, Dietrich J, Kristiansen G, Brossart P, Landsberg J, Strieth S, Dietrich D. CTLA4 DNA methylation is associated with CTLA-4 expression and predicts response to immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2023: 112

Hosokawa H, Rothenberg EV. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018; 10: a028621

Huang R-Y, Francois A, McGray AR, Miliotto A, Odunsi K. Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology*. 2017; 6: e1249561

Huang RSP, Murugesan K, Montesion M, Pavlick DC, Mata DA, Hiemenz MC, Decker B, Frampton G, Albacker LA, Ross JS. Pan-cancer landscape of CD274 (PD-L1) copy number changes in 244 584 patient samples and the correlation with PD-L1 protein expression. *J Immunother Cancer*. 2021; 9: e002680

Heydt C, Fassunke J, Künstlinger H, Ihle MA, König K, Heukamp LC, Schildhaus H-U, Odenthal M, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLoS One*. 2014; 9: e104566

Ionna F, Bossi P, Guida A, Alberti A, Muto P, Salzano G, Ottaiano A, Maglitto F, Leopardo D, De Felice M, Longo F, Tafuto S, Della Vittoria Scarpati G, Perri F. Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Big and Intriguing Challenge Which May Be Resolved by Integrated Treatments Combining Locoregional and Systemic Therapies. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 2371

Klümper N, Ralser DJ, Bawden EG, Landsberg J, Zarbl R, Kristiansen G, Toma M, Ritter M, Hölzel M, Ellinger J, Dietrich D. LAG3 (LAG-3, CD223) DNA methylation correlates

with LAG3 expression by tumor and immune cells, immune cell infiltration, and overall survival in clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2020; 8: e000552

Klümper N, Ralser DJ, Zarbl R, Schlack K, Schrader AJ, Rehlinghaus M, Hoffmann MJ, Niegisch G, Uhlig A, Trojan L, Steinestel J, Steinestel K, Wirtz RM, Sikic D, Eckstein M, Kristiansen G, Toma M, Hölzel M, Ritter M, Strieth S, Ellinger J, Dietrich D. CTLA4 promoter hypomethylation is a negative prognostic biomarker at initial diagnosis but predicts response and favorable outcome to anti-PD-1 based immunotherapy in clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2021; 9: e002949

Klümper N, Wüst L, Saal J, Ralser DJ, Zarbl R, Jarczyk J, Breyer J, Sikic D, Wullich B, Bolenz C, Roghmann F, Hölzel M, Ritter M, Strieth S, Hartmann A, Erben P, Wirtz RM, Landsberg J, Dietrich D & Eckstein M. PD-L1 (CD274) promoter hypomethylation predicts immunotherapy response in metastatic urothelial carcinoma. *Oncol Immunology*. 2023: 2267744

Klümper NB. Identifizierung prädiktiver statischer und on-treatment Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens auf Immuncheckpoint-Inhibition im Nierenzellkarzinom [Internet] [Thesis]. 2024: Verfügbar unter: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-73786> Zugriff: 10.02.2025

Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, Weickmann S, Fleischhacker M, Liebenberg V, Field JK, Dietrich D. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol*. 2011: 1632–1638

Lechner M, Liu J, Masterson L, Fenton TR. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022; 19: 306–327

Lee CG, Sahoo A, Im SH. Epigenetic regulation of cytokine gene expression in T lymphocytes. *Yonsei Med J*. 2009: 322–330

Lee HH, Wang YN, Xia W, Chen CH, Rau KM, Ye L, Wei Y, Chou CK, Wang SC, Yan M, Tu CY, Hsia TC, Chiang SF, Chao KSC, Wistuba II, Hsu JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Removal of N-Linked Glycosylation Enhances PD-L1 Detection and Predicts Anti-PD-1/PD-L1 Therapeutic Efficacy. *Cancer Cell*. 2019: 168-178.e4

Lee JB, Ha SJ, Kim HR. Clinical Insights Into Novel Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Pharmacol*. 2021: 681320

Lei Q, Wang D, Sun K, Wang L, Zhang Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front Cell Dev Biol*. 2020: 672

Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, Rutqvist LE. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*. 1998; 82: 1367–1375

Li C-W, Lim S-O, Xia W, Lee H-H, Chan L-C, Kuo C-W, u. a. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun*. 2016; 7: 12632

Li R, Qiu J, Zhang Z, Qu C, Tang Z, Yu W, Tian Y, Tian H. Prognostic significance of Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in patients with solid tumors: a systematic review, meta-analysis and pan-cancer analysis. *Cancer Cell Int*. 2023: 306

Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol*. 2011: 11–21

Loyfer N, Magenheim J, Peretz A, Cann G, Bredno J, Klochendler A, u. a. A DNA methylation atlas of normal human cell types. *Nature*. 2023: 355–364

Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*. 2018: 1336–1340

Ma X, Wang YW, Zhang MQ, Gazdar AF. DNA methylation data analysis and its application to cancer research. *Epigenomics*. 2013: 301–316

Maasland DHE, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RAS, Schouten LJ. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 2014; 14: 187

Meccariello G, Maniaci A, Bianchi G, Cammaroto G, Iannella G, Catalano A, Sgarzani R, De Vito A, Capaccio P, Pelucchi S, Vicini C. Neck dissection and trans oral robotic surgery for oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2022: 117–125

Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AK-Y. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 2020; 12: 16

Micevic G, Thakral D, McGeary M, Bosenberg MW. PD-L1 methylation regulates PD-L1 expression and is associated with melanoma survival. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019: 435–440

Mirzamani N, Salehian P, Farhadi M, Tehran EA. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. *Exp Mol Pathol*. 2006: 231–234

Mo X, Zhang H, Preston S, Martin K, Zhou B, Vadalía N, Gamero AM, Soboloff J, Tempera I, Zaidi MR. Interferon- $\gamma$  Signaling in Melanocytes and Melanoma Cells Regulates Expression of CTLA-4. *Cancer Res.* 2018: 436–450

Momparler RL. A Perspective on the Comparative Antileukemic Activity of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) and 5-Azacytidine (Vidaza). *Pharmaceuticals (Basel)*. 2012: 875–881

Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol.* 2000; 183: 145–154

Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013: 23–38

Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Powles T, Donskov F, Plimack ER, Barthélémy P, Hammers HJ, George S, Grünwald V, Porta C, Neiman V, Ravaud A, Choueiri TK, Rini BI, Salman P, Kollmannsberger CK, Tykodi SS, Grimm MO, Gurney H, Leibowitz-Amit R, Geertsens PF, Amin A, Tomita Y, McHenry MB, Saggi SS, Tannir NM. Survival outcomes and independent response assessment with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma: 42-month follow-up of a randomized phase 3 clinical trial. *J Immunother Cancer.* 2020; 8: e000891

Network CGA. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015: 576–582

Newell F, Pires da Silva I, Johansson PA, Menzies AM, Wilmott JS, Addala V, Carlino M S, Rizos H, Nones K, Edwards JJ, Lakis V, Kazakoff SH, Mukhopadhyay P, Ferguson P M, Leonard C, Koufariotis LT, Wood S, Blank CU, Thompson JF, Spillane AJ, Shannon KF, Pearson JV, Mann GJ, Hayward NK, Scolyer RA, Waddell N, Long GV. Multiomic profiling of checkpoint inhibitor-treated melanoma: Identifying predictors of response and resistance, and markers of biological discordance. *Cancer Cell.* 2022: 88-102.e7

Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2022: 131

Nygaard V, Holden M, Løland A, Langaas M, Myklebost O, Hovig E. Limitations of mRNA amplification from small-size cell samples. *BMC Genomics.* 2005: 147

Ogbuji V, Paster IC, Recio-Boiles A, Carew JS, Nawrocki ST, Chipollini J. Current Landscape of Immune Checkpoint Inhibitors for Metastatic Urothelial Carcinoma: Is There a Role for Additional T-Cell Blockade? *Cancers (Basel)*. 2023; 16: 131

Onkologie Leitlinienprogramm. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms [Internet]. Langversion 2.0- März 2020: Verfügbar unter:[https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version\\_2.0/LL\\_Harnblasenkarzinom\\_Langversion\\_2.0.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf) : Zugriff: 11.12.2024

Onkologie Leitlinienprogramm. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms [Internet]. Leitlinienprogramm Onkologie, Version 3.0-März 2021 Verfügbar unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version\\_3/LL\\_Mundhoehlenkarzinom\\_Kurzversion\\_3.0.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Kurzversion_3.0.pdf) : Zugriff: 10.10.2024

Pertesi M, Ekdahl L, Palm A, Johnsson E, Järvstråt L, Wihlborg AK, Nilsson B. Essential genes shape cancer genomes through linear limitation of homozygous deletions. *Commun Biol.* 2019: 262

Plank JL, Dean A. Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together. *Mol Cell.* 2014: 5–14

Putri JF, Widodo N, Sakamoto K, Kaul SC, Wadhwa R. Induction of senescence in cancer cells by 5'-Aza-2'-deoxycytidine: Bioinformatics and experimental insights to its targets. *Comput Biol Chem.* 2017: 49–55

Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist.* 2010: 994–1001

Ralser DJ, Klümper N, Gevensleben H, Zarbl R, Kaiser C, Landsberg J, Hölzel M, Strieth S, Faridi A, Abramian A, Dietrich D. Molecular and Immune Correlates of PDCD1 (PD-1), PD-L1 (CD274), and PD-L2 (PDCD1LG2) DNA Methylation in Triple Negative Breast Cancer. *J Immunother.* 2021: 319–324

Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, Wagner S, Klussmann JP. A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. *Cancer Med.* 2019: 1908–1918

Rizzo A, Mollica V, Massari F. Expression of Programmed Cell Death Ligand 1 as a Predictive Biomarker in Metastatic Urothelial Carcinoma Patients Treated with First-line Immune Checkpoint Inhibitors Versus Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus.* 2022: 152–159

Sailer V, Sailer U, Bawden EG, Zarbl R, Wiek C, Vogt TJ, Dietrich J, Loick S, Grünwald I, Toma M, Golletz C, Gerstner A, Kristiansen G, Bootz F, Scheckenbach K, Landsberg J,

Dietrich D. DNA methylation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in head and neck squamous cell carcinomas correlates with IDO1 expression, HPV status, patients' survival, immune cell infiltrates, mutational load, and interferon  $\gamma$  signature. *EBioMedicine*. 2019; 341–352

Schache AG, Powell NG, Cuschieri KS, Robinson M, Leary S, Mehanna H, u. a. HPV-Related Oropharynx Cancer in the United Kingdom: An Evolution in the Understanding of Disease Etiology. *Cancer Res*. 2016; 76: 6598–6606

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 426–437

Sommer U, Eckstein M, Ammann J, Braunschweig T, Macher-Göppinger S, Schwamborn K, Hieke-Schulz S, Harlow G, Flores M, Wullich B, Wirth M, Roth W, Knüchel R, Weichert W, Baretton G, Hartmann A. Multicentric Analytical and Inter-observer Comparability of Four Clinically Developed Programmed Death-ligand 1 Immunohistochemistry Assays in Advanced Clear-cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2020: e629–e642

Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev*. 2011; 244: 169–187

Thompson LDR, Bishop JA. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol*. 2022; 16: 1–18

Toden S, Zumwalt TJ, Goel A. Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021: 188491

Tonni E, Oltrecolli M, Pirola M, Tchawa C, Roccabruna S, D'Agostino E, Matranga R, Piombino C, Pipitone S, Baldessari C, Bacchelli F, Dominici M, Sabbatini R, Vitale MG. New Advances in Metastatic Urothelial Cancer: A Narrative Review on Recent Developments and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2024; 25: 9696

Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*. 1990: 1393–1405

Tully KH, Jütte H, Wirtz RM, Jarczyk J, Santiago-Walker A, Zengerling F, Breyer J, Sikic D, Kriegmair MC, von Hardenberg J, Wullich B, Taubert H, Weyerer V, Stoehr R, Bolenz C, Burger M, Porubsky S, Hartmann A, Roghmann F, Erben P, Eckstein M. Prognostic Role of FGFR Alterations and FGFR mRNA Expression in Metastatic Urothelial Cancer Undergoing Checkpoint Inhibitor Therapy. *Urology*. 2021: 93–101

Valk E, Rudd CE, Schneider H. CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol.* 2008: 272–279

Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2014: 123–141

Vogt T, Dietrich J, Strieth S et al. BTLA DNA methylation and mRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngo-Rhino-Otologie* 2022; 101(S02): 200 - 200. doi:10.1055/s-0042-1746609

Wang YN, Lee HH, Wei Y, Chu YY, Xia W, Wang M, Yu D, Hung M-C. An optimized protocol for PD-L1 pathological assessment with patient sample deglycosylation to improve correlation with therapeutic response. *STAR Protoc.* 2022; 3: 101198

Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X, Murphy TL, Russell JH, Allison JP, Murphy KM. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol.* 2003: 670–679

Wahida A, Buschhorn L, Fröhling S, Jost PJ, Schneeweiss A, Lichter P, Kurzrock R. The coming decade in precision oncology: six riddles. *Nat Rev Cancer.* 2023: 43–54

Yu EY, Petrylak DP, O'Donnell PH, Lee JL, van der Heijden MS, Loriot Y, Stein MN, Necchi A, Kojima T, Harrison MR, Hoon Park S, Quinn DI, Heath EI, Rosenberg JE, Steinberg J, Liang SY, Trowbridge J, Campbell M, McGregor B, & Balar AV. Enfortumab vedotin after PD-1 or PD-L1 inhibitors in cisplatin-ineligible patients with advanced urothelial carcinoma (EV-201): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2021: 872–882

Zhang W, Shi L, Zhao Z, Du P, Ye X, Li D, Cai Z, Han J, Cai J. Disruption of CTLA-4 expression on peripheral blood CD8 + T cell enhances anti-tumor efficacy in bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019: 911–920

Zhang Y, Rungay H, Li M, Yu H, Pan H, Ni J. The global landscape of bladder cancer incidence and mortality in 2020 and projections to 2040. *J Glob Health.* 2023; 13: 04109

Zhao N, Guo M, Zhang C, Wang C, Wang K. Pan-Cancer Methylated Dysregulation of Long Non-coding RNAs Reveals Epigenetic Biomarkers. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10: 882698

## **9. Erklärung zum Eigenanteil**

Im Rahmen meiner Dissertation erfolgte die Planung der Experimente in enger Abstimmung mit PD Dr. Dimo Dietrich. Die Experimente, deren Ergebnisse nicht veröffentlicht wurden, habe ich eigenverantwortlich und selbstständig durchgeführt, ausgewertet und dargestellt, wobei ich bei den Experimenten, die in gemeinsamen Publikationen enthalten sind, in Kooperation mit Mitgliedern der Forschungsgruppe zusammengearbeitet habe (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). In einzelnen Textpassagen habe ich zur sprachlichen Formulierung unterstützend KI-Module wie ChatGPT und Perplexity AI verwendet. Nach der Verwendung dieser Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Die Interpretation von experimentellen Daten aus den Publikationen, an denen ich als Coautor beteiligt war, erfolgte gemeinsam mit meiner Forschungsgruppe (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). Die klinischen Daten, die in dieser Dissertation verwendet wurden, stammen aus den entsprechenden Publikationen, in denen ich als Coautor genannt bin (Hoffmann et al., 2023; Klümper et al., 2023). An der Erhebung und Auswertung dieser klinischen Daten war ich nicht beteiligt. Die Interpretation von nicht publizierten Ergebnissen wurde von mir in den Kontext der wissenschaftlichen Fragestellung eingeordnet.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

## 10. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr. rer. nat. Dimo Dietrich an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Bonn angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Dimo Dietrich, meinem Doktorvater, für die Überlassung des spannenden Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Ich danke ihm für seine Geduld, seine konstruktive Kritik und seine Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern, Dr. med. Burckhard Wüst und Lydia Wüst, für ihre bedingungslose Unterstützung.

Mein Dank richtet sich ebenso an Romina Zarbl, B.Sc., Angelina Espig und Pia Kuster, die mich im Labor eingearbeitet haben und mit ihrem Fachwissen meine Arbeit unterstützt haben.